

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SPÉCIFICITÉ DE L'EXPRESSION DES GÈNES *CBF* CHEZ LE BLÉ  
HEXAPLOÏDE *Triticum aestivum* L.

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
ZAKIA DJILLALI

JUILLET 2013

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL**  
**Service des bibliothèques**

**Avertissement**

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier les professeurs Fathey Sarhan et Jean Danyluk de m'avoir accepté au sein de leur équipe. Je remercie particulièrement mon directeur de recherche pour ses remarques constructives, ses conseils et son suivi tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais exprimer ma pleine gratitude et mes remerciements les plus sincères à mes amis et collègues : Sara, Estelle, Joseph, Mohamed Ali, Khalil, Zahra, Mélanie et Amadou.

Enfin, je remercie tous les membres de ma famille, pour leur soutien et leurs encouragements.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	ix
RÉSUMÉ .....	xi
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I	
REVUE DE LITTÉRATURE.....	5
1.1 Impact du froid sur la plante .....	5
1.2 Acclimatation et tolérance au gel.....	6
1.3 Modifications biochimiques au cours de l'acclimatation .....	7
1.3.1 Stabilisation de la membrane cytoplasmique .....	7
1.3.2 Réduction du stress oxydatif.....	8
1.3.3 Synthèse d'osmo-protecteurs.....	9
1.3.4 Synthèse de protéines cryoprotectrices.....	9
1.4 Régulation de l'expression des gènes dans la réponse au froid .....	11
1.4.1 Voies d'expression des gènes en réponse au froid .....	12
1.4.2 Gènes <i>COR</i> et leur régulation.....	13
1.4.3 Facteurs de transcription <i>AP2</i> .....	14
1.4.4 <i>CBF</i> et leur rôle dans la tolérance au froid.....	19



1.4.5 Régulation en amont des gènes <i>CBF</i> .....	25
1.4.6 Spécificité d'expression des gènes en réponse au stress.....	26
CHAPITRE II	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	30
2.1 Matériel végétal .....	30
2.2 Préparation des sondes.....	32
2.3 Northern blot.....	35
2.3.1 Extraction des ARN.....	35
2.3.2 Préparation du gel ARN et de la membrane .....	36
2.3.3 Détection des ARN par hybridation avec les sondes.....	37
2.4 Hybridation <i>in situ</i> .....	38
2.4.1 Fixation et préparation des tissus.....	38
2.4.2 Hybridation des sondes.....	39
CHAPITRE III	
RÉSULTATS.....	40
3.1 Analyse de l'expression des <i>CBF</i> par northern blot .....	40
3.2 Hybridation <i>in situ</i> (HIS) .....	44
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	49
APPENDICE A.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	78

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Diagramme de la structure des protéines ERF du groupe III chez <i>Arabidopsis</i> , relation phylogénétique entre les différents gènes (de Nakano <i>et al.</i> , 2006).....	18
1.2 Classification des <i>CBF</i> chez les monocotylédones (de Badawi <i>et al.</i> , 2007). L'alignement des séquences nucléotidiques correspondantes au domaine AP2 et des motifs conservés CMIII-3 (PKK/RPAGR <sub>x</sub> KFxETRHP) et CMIII-1 (DSAWR) a été produite par ClustalW. L'analyse phylogénétique a été effectuée selon le modèle d'évolution minimum avec le paramètre de Kimura-2 (Badawi <i>et al.</i> , 2007).....	21
1.3 Schéma des principales voies de régulation dans l'expression des gènes en réponse au froid (de Chinnusamy <i>et al.</i> , 2007).....	27
2.1 Plantule de blé ( <i>Triticum aestivum</i> cv Wonder) âgée d'une semaine avec les différentes parties de la plante prélevées pour l'extraction des ARN, et les coupes histologiques. R, racine; B, collet; T1, tige proche du collet; T2, tige proche de la feuille; F1, feuille proche de la tige; F2, milieu de la feuille- F3, extrémité de la feuille.....	31
3.1 Profils d'expression des <i>CBF</i> dans les différents tissus de plantes de blé de 7 jours exposées au froid.....	42
3.2 Coupes transversales dans la tige du blé exposé 4 h à 4°C et hybridées avec les sondes anti-sens CBFIIIId-12.1(a) et CBFIIIId-A15 (b).....	46
3.3 Coupes transversales dans la feuille (F2) du blé exposé 4 h à 4°C et hybridées avec la sonde anti-sens CBFIIIId-12.1. Les structures et types cellulaires sont indiqués dans la figure montrant le grossissement.....	47
3.4 Coupes transversales dans la feuille (F2) du blé exposé 4 h à 4°C et hybridées avec les sondes anti-sens CBFIIIId-A15. Les structures et types cellulaires sont indiqués dans la figure montrant le grossissement.....	48
A.1 Optimisation des conditions PCR en évaluant plusieurs dilutions d'ADN génomique de Manitou pour 4 gènes <i>CBF</i> . Les amorces (Ma02-Ma06) pour les gènes <i>CBF</i> sont décrites dans le Tableau A1. L'amplification a été effectuée en utilisant les amorces spécifiques (0.3 uM chaque), 10–20 ng	

	d'ADN génomique, 1X de solution enhancer, et l'ADN polymérase Pfx (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le PCR est initié avec une incubation de 120 s à 94 °C suivi de 45 cycles de 94 °C pour 20 s, 60 °C pour 20 s, et 68 °C pour 60 s.....	66
A.2	Amplification PCR des gènes <i>CBF</i> de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma01-Ma24. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1.....	67
A.3	Amplification PCR des gènes <i>CBF</i> de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma25-Ma53. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1.....	67
A.4	Amplification PCR des gènes <i>CBF</i> de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma54-Ma62. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1.....	68
A.5	Amplification PCR des gènes <i>CBF</i> de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma01-Ma62. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1 excepté qu'ici la température d'appariement était de 58°C pour 20 s.....	69
A.6	Digestion EcoRI de plasmides (M01-M20). Les produits d'amplification (Figs. A.1 à A.5) avec des tailles attendues (identifiés ici par leur numéro 02 à 10) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 2 à 3 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M01-M20). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	70
A.7	Digestion EcoRI de plasmides (M21-M40). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par leur numéro 10 à 21) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 7 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M21-M40). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	71
A.8	Digestion EcoRI de plasmides (M41-M60). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par leur numéro 22 à 29) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 3 à 5 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M41-M60). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	72

A.9	Digestion EcoRI de plasmides (M61-M80). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 30 à 38) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 3 à 4 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M61-M80). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	73
A.10	Digestion EcoRI de plasmide (M81-M100). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 39 à 44) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 7 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M81-M100). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	74
A.11	Digestion EcoRI de plasmide (M101-M120). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 44 à 51) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 4 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M101-M120). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	75
A.12	Digestion EcoRI de plasmide (M121-M140). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 52 à 60) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 2 à 3 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M121-M140). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	76
A.13	Digestion EcoRI de plasmide (M141-M150). Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 60 à 04) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 3 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M141-M150). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.....	77

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Amorces utilisées pour la fabrication des sondes <i>CBF</i> , utilisées pour les expériences northern et hybridation <i>in situ</i> .....	34
A.1	Les amorces spécifiques utilisées dans l'amplification des gènes <i>TaCBF</i> à partir de l'ADN génomique de différents cultivars de blé.....	60

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABA	Acide abscissique
ABRE	ABA-Responsive Element
AFP	Antifreeze proteins
AP2	APETALA2
AREB	ABA Responsive Element Binding Protein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt
CBF	C-repeat binding factor
CoA	Acetyl-coenzyme A carboxylase
COR	Cold-regulated
CRT	C repeat
CS	Cold Specific
DRE	Dehydration-Responsive Element
DREB	DRE-binding protein
ERD	Early Dehydration-inducible
EREBP	Ethylene responsive element binding protein
ERF	Ethylene-responsive element binding factor
GA	Glutaraldéhyde
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
ICE 1	Inducer of CBF expression 1

LEA	Late Embryogenesis Abundant
LTl	Low Temperature Induced
LTP	Lipid transfer protein
NBT	Nitroblue tetrazolium chloride
PFA	Paraformaldéhyde
PVA	Polyvinyl alcohol
RD	Responsive to Dessication
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
TBA	Ter-butanol



## RÉSUMÉ

Afin de s'adapter au froid, les plantes induisent l'expression d'une multitude de gènes qui sont sous le contrôle de plusieurs types de facteurs de transcription. Une des familles qui a été très largement impliquée dans le processus d'acclimatation au froid comprend les facteurs de transcription CBF (C-repeat Binding Factor). Chez le blé hexaploïde, 65 gènes *CBF* ont été identifiés et classés dans dix groupes de structures différentes. Le but de ce travail est de démontrer une spécificité d'expression des *CBF* dans les organes de la plante ainsi que dans les tissus et les cellules. L'expression de ces gènes a été induite en soumettant les plantes de blé « Wonder » âgées d'une semaine à une température de 4°C pendant 4h et 28h. Différentes parties de la plante (racines, collets, tiges et feuilles) ont été utilisées afin de détecter la présence des ARNm, en utilisant les techniques d'immunobuvardage de type northern et d'hybridation *in situ*. Les résultats ont permis d'enregistrer plusieurs types de réponses telle que la réponse transitoire, la réponse constitutive ainsi qu'une spécificité d'expression tissulaire et cellulaire. Parmi les 13 gènes étudiés, on a noté une forte abondance des transcrits *CBFIVd-9.1*, *CBFIId-12.1*, *CBFIId-B19* et *CBFIVd-A22* dans les feuilles par rapport à *CBFIVc-14.1* qui était plus abondant dans la tige. Par ailleurs, *CBFIVd-9.1* était le seul à être exprimé dans les racines. Les profils d'expression des *CBF* étaient variables entre les gènes des différents groupes et au sein d'un même groupe. Également, des variations d'accumulation des transcrits ont été enregistrées entre les plantes exposées à 4°C pendant 4 h et les plantes exposées à 4°C pendant 28 h. L'hybridation *in situ* a montré que l'accumulation des *CBF* était variable entre les tissus. Ainsi, les transcrits *CBFIId-12.1* sont accumulés dans le mésophylle de la feuille tandis que ceux de *CBFIId-A15* sont spécifiquement retrouvés dans l'épiderme. Ces résultats montrent que les *CBF* étudiés ont des expressions spécifiques et/ou complémentaires et suggèrent que les mécanismes d'acclimatation nécessitent l'action coordonnée de plusieurs CBF pour le développement optimale de la tolérance au gel. Ils fournissent des informations fondamentales sur l'importance des différents CBF et permettront aux agronomes de mieux sélectionner des variétés de blé à l'aide de marqueurs moléculaires associés aux CBF.

Mots clés : Acclimatation, froid, *CBF*, facteurs de transcription, blé.



## INTRODUCTION

Les rendements en agriculture demeurent affectés par le climat. Les stress abiotiques, en particulier les températures extrêmes, ont une énorme influence sur les rendements. Le froid qui sévit dans les zones agricoles du Canada nuit au développement des cultures et les gelées de printemps peuvent causer des pertes importantes. La production des céréales qui sont importantes pour la nutrition humaine se trouve grandement affectée. Selon les estimations de la commission canadienne du blé, les récoltes sont passées de 20 millions de tonnes en 2008 à 16,5 millions de tonnes en 2009, essentiellement à cause du froid et la sécheresse des sols qui ont sévèrement touché la région des Prairies (<http://www.cwb.ca/public/fr/newsroom/releases/2009/061109.jsp>). À cause du froid intense, le Canada cultive essentiellement les variétés de blé de printemps. Il est connu que les variétés de blé d'hiver (qui sont semées en automne) sont plus productives que les variétés de blé de printemps car elles commencent leur croissance plus tôt au printemps ce qui leur permet d'avoir une biomasse plus importante et donc plus de grains. Par ailleurs les pertes de rendements persistent avec les variétés de printemps à cause des gelées tardives d'où l'intérêt des variétés d'hiver qui ont la capacité de supporter des températures plus basses.

Pour survivre au gel, le blé d'hiver s'adapte graduellement aux basses températures en induisant l'expression de plusieurs gènes. Ce phénomène est appelé acclimatation. De nombreuses études portées sur ce phénomène ont permis d'identifier plusieurs groupes de gènes notamment les gènes *COR* (Cold Regulated) et *CBF* (C-repeat Binding Factor). Les gènes *COR* sont exprimés quelques heures après l'exposition des plantes aux basses températures. Ils codent pour des protéines qui vont protéger la plante contre les dommages causés par le froid, tels que les LEA, les chaperones et les enzymes de biosynthèse d'antioxydants et d'osmo-protecteurs. Au niveau de leur promoteur existe une séquence consensus CCGAC qui permet la liaison d'une deuxième catégorie de protéines appelée CBF.

Ainsi, les CBF sont des régulateurs des gènes *CORs* qui se trouvent en amont de la voie de réponse au froid. Par conséquent, ils s'expriment plus rapidement que les gènes *CORs*.

Les CBF sont des facteurs de transcription majeurs dans la réponse au froid. Ils sont retrouvés chez plusieurs angiospermes, et leur régulation semble grandement influencer le niveau de tolérance au gel. Notre équipe a identifié 65 gènes *CBF* chez le blé hexaploïde (Mohseni, 2011), un nombre élevé comparé à *Arabidopsis thaliana* et aux autres espèces. La conservation de tous ces *CBF* chez le blé suggère qu'au cours de l'évolution, s'est opérée une spécialisation dans la fonction de ces gènes. Cette spécialisation peut se situer à plusieurs niveaux tels que: **i)** une expression spatiale dans les tissus et organes de la plante ou une expression temporelle liée au stade de développement de la plante; **ii)** une régulation de groupes spécifiques de gènes *COR* en liant une ou un ensemble de séquences spécifiques sur l'ADN; **iii)** une interaction spécifique avec diverses protéines et voies de signalisation.

Les *CBF* du blé ont été classés dans 10 groupes (Badawi *et al.*, 2007) démontrant des caractéristiques structurales particulières. Six de ces groupes (*CBFIIIc*, *CBFIIId*, *CBFIVa*, *CBFIVb*, *CBFIVc* et *CBFIVd*) sont spécifiques aux poïdeae et sont associés à la tolérance au froid (Badawi *et al.*, 2007).

L'objectif de mon travail est de caractériser les sites d'accumulation de certains transcrits *CBF* entre les différents organes et tissus chez une variété de blé d'hiver « Wonder » et vérifier par là l'hypothèse qu'une spécificité d'expression existe chez les *CBF*. Ainsi, les différences d'expression peuvent révéler des différences de fonction des protéines correspondantes.

En effet, les gènes *COR Wcor14*, *Wcor15* et *Wcs19* ont été spécifiquement détectés dans les feuilles du blé. Ils codent pour des protéines chloroplastiques et joueraient un rôle dans la protection du système photosynthétique contre les stress, notamment ceux causés par le froid (Kobayashi *et al.*, 2004)

Ma démarche a été de choisir, dans la limite du possible, au moins un *CBF* de chaque groupe afin de comparer les groupes de *CBF* entre eux. Pour d'autres, j'ai choisi plus d'un *CBF* afin de pouvoir affecter une même fonction aux *CBF* d'un même groupe. Ainsi dans ce travail, j'ai analysé 13 *CBF* représentant 8 des 10 groupes en utilisant les méthodes d'immunobuvardage de type northern et d'hybridation *in situ*. Ces techniques permettent de localiser les sites d'accumulation des transcrits *CBF* dans les tissus et organes de la plante et de là faire des corrélations entre les lieux d'expression et la fonction possible de ces gènes dans les mécanismes de tolérance au froid. En effet, des fonctions spécifiques pourraient être potentiellement affectées à des gènes ou groupes de gènes.

Ces résultats motiveront des études futures afin de caractériser les lieux d'expression de tous les *CBF* identifiés jusqu'à présent chez le blé, voire étudier leur régulation et interactions.

## CHAPITRE I

### REVUE DE LITTÉRATURE

La céréaliculture représente un secteur économique important pour le pays, au niveau national et international. En effet, les céréales dont le blé employé dans la fabrication du pain et des pâtes alimentaires demeurent l'aliment de base de l'homme. Le Canada produit en moyenne 20 millions de tonnes de blé par an (Statistique Canada : [www.statcan.gc.ca](http://www.statcan.gc.ca)). Cette production peut être augmentée par un meilleur contrôle des facteurs qui causent les pertes de rendements, et qui empêchent l'extension de la surface emblavée. Effectivement, le blé ainsi que toutes les grandes cultures se trouvent confrontés à un ensemble de facteurs limitants dont le climat. Au Canada, le climat est spécialement caractérisé par des gels intenses qui surviennent en automne ou tardivement au printemps perturbant ainsi la croissance des cultures et causant des pertes de rendements très considérables. Ainsi, l'étude des mécanismes de tolérance au gel du blé est d'une importance stratégique. Le blé représente aussi un modèle d'étude qui pourrait être extrapolé à d'autres espèces monocotylédones.

Le blé est un membre de la famille des poacées qui appartient à la sous famille des poïdeae et au genre *Triticum*. Parmi toutes les types de blé sauvages et cultivées, il existe le blé diploïde (14 chromosomes), le blé tétraploïde (28 chromosomes) et le blé hexaploïde (42

chromosomes). Le blé tendre a un génome hexaploïde, il est caractérisé par un grain riche en amidon et est utilisé pour la fabrication de farines panifiables. Le blé dur au contraire est tétraploïde et possède un grain riche en gluten. Il est essentiellement utilisé dans la fabrication de pâtes alimentaires. Le blé hexaploïde qui constitue le centre d'intérêt de notre recherche est composé de trois génomes de sept paires de chromosomes (AA, BB, DD). Les trois génomes proviennent de trois espèces différentes dont le *Triticum urartu* pour le génome AA et *Aegilops speltoides* pour le génome DD. Il semblerait qu'une espèce proche d'*Aegilops speltoides* appelée *Aegilops tauschii* est à l'origine du génome BB (Petersen *et al.*, 2006).

On distingue deux types majeurs de blé hexaploïde : le blé d'hiver et le blé de printemps. Le blé d'hiver est semé en automne dans les régions méditerranéennes et tempérées. Le blé de printemps lui est semé au printemps essentiellement dans les pays à hiver dur tels qu'au Canada.

### 1.1 Impact du froid sur la plante

Le stress au froid est causé par les températures gélives inférieures à 0°C (freezing) ainsi que par les basses températures comprises entre 0 et 15°C (chilling). Il occasionne l'altération de plusieurs fonctions biochimiques, physiologiques et métaboliques dans la plante.

Les basses températures induisent essentiellement un stress oxydatif en modifiant la structure des membranes qui perdent de leur flexibilité et deviennent plus rigides. Il se produit alors une fuite d'ions et une désactivation des protéines membranaires (Upchurch, 2008).

Les températures gélives quant à elles, induisent un stress similaire à celui causé par la sécheresse (Thomashow, 1998). En effet, les températures en dessous de 0°C provoquent la déshydratation des cellules en formant de la glace dans les espaces intercellulaires. Ce phénomène est appelé nucléation (Zachariassen et Kristiansen, 2000). Le noyau de glace attire vers lui les molécules d'eau qui se cristallisent autour, et augmentent le volume de la glace. Ceci provoque le transfert de l'eau du cytoplasme vers l'espace extracellulaire d'où une déshydratation des cellules (Sharma *et al.*, 2005). En plus de la déshydratation, les cristaux de glace peuvent créer des lésions au niveau des membranes (Thomashow, 1998). Afin de protéger les cellules contre les dommages qui peuvent être occasionnés par le gel, certaines plantes sont capables de s'acclimater au froid.

## 1.2 Acclimatation et tolérance au gel

L'acclimatation au froid est assurée par l'exposition des plantes, pendant une certaine durée de temps, à de basses températures non gélives. Dans les conditions en champs, ce phénomène a naturellement lieu en automne lorsque les températures commencent à baisser autour de 10°C. Ceci permet aux plantes, d'adapter progressivement leur métabolisme au froid de l'hiver et de tolérer le gel. Toutefois, les plantes ne répondent pas toutes de la même façon aux basses températures. Sharma *et al.* (2005) les ont subdivisé en trois catégories : les plantes sensibles au froid endommagées par des températures inférieures à 10°C, les plantes sensibles au gel et enfin, les plantes tolérantes au gel. La majorité des plantes tempérées tels que le canola, *Arabidopsis* et les céréales d'hiver (blé, orge, seigle) sont capables de tolérer les basses températures et le gel. En effet certaines variétés de blé d'hiver après une phase d'acclimatation, peuvent atteindre une TL50 (Température Létale pour 50% des plantes) de -27°C. Au contraire, les plantes des régions tropicales comme la tomate, le maïs et le riz sont incapables de s'acclimater et sont endommagées lorsque exposées à des températures inférieures à 12°C.

Ainsi, l'acclimatation appelé aussi endurcissement au froid conduit à un ensemble de modifications biochimiques et moléculaires qui permet le fonctionnement normal des cellules sans dommages physiologiques (Thomashow, 1999).

### 1.3 Modifications biochimiques au cours de l'acclimatation

L'acclimatation au froid s'accompagne généralement d'une synthèse de nombreux composés (lipides, sucres, protéines) qui vont contribuer à la stabilisation des membranes, au maintien de l'équilibre osmotique et à la protection contre le gel.

#### 1.3.1 Stabilisation de la membrane cytoplasmique

L'effet nocif des basses températures sur les membranes, provient de l'accroissement des zones rigides dans la matrice lipidique. Des mécanismes biochimiques destinés à maintenir la fluidité initiale des membranes sont déclenchés lors de l'acclimatation. Il se produit une augmentation des phospholipides de la membrane plasmique tel le cas chez *Arabidopsis* et l'avoine (Uemura *et al.*, 1995), mais aussi du degré d'insaturation des acides gras constitutifs des lipides membranaires (Côme, 1992).

Uemura et Steponkus (1997) ont montré chez le seigle que même les membranes de l'enveloppe chloroplastique subissent des modifications dans la composition lipidique après une période d'acclimatation au froid. Il se produit une diminution de la quantité de monogalactosyl diacylglycérol dans les membranes interne et externe du chloroplaste et une augmentation de la quantité de phosphatidylcholine dans la membrane externe du chloroplaste (Uemura et Steponkus, 1997). Par ailleurs, Iba (2002), a montré que



l'augmentation des acides triénoïques (Tas) dans les membranes chloroplastiques avait amélioré la tolérance des plantes aux basses températures. De même, selon Upchurch (2008), le maintien du niveau des acides gras poly-insaturés hexadécatriénoïques de type 16:3, et linoléiques de type 18:3 dans les membranes lipidiques des chloroplastes, ont contribué à la survie des plantes aux basses températures. L'ajustement de la fluidité des membranes permet ainsi de maintenir un environnement favorable pour l'activité des protéines intégrées et par conséquent un meilleur contrôle des flux métaboliques et des ions.

### 1.3.2 Réduction du stress oxydatif

La perturbation de la fluidité membranaire conduit à une inhibition du transport des électrons au niveau des photosystèmes PSII et PSI. Ceci provoque à son tour une production de dérivés réactifs de l'oxygène appelés communément éléments ROS (reactive oxygen species). Parmi eux les anions superoxyde  $O_2^-$  qui sont le produit de la réduction de l' $O_2$  dans le photosystème I du chloroplaste. Il a été rapporté par Suzuki et Mittler (2006) que le superoxyde  $O_2^-$  produit par le NADPH oxydase suite à l'exposition aux basses températures semble jouer un rôle dans la transmission du signal. Les autres éléments ROS sont les radicaux hydroxyles OH et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Chez l'orge, la synthèse des dérivés ROS endommage fortement le photosystème PSI, ce qui réduit l'activité photosynthétique (Huner *et al.*, 1993). Leonardos *et al.* (2003) ont rapporté que chez le blé d'hiver exposé au froid, il se produit d'abord une inhibition de la photosynthèse mais pas une augmentation de la capacité photosynthétique durant l'acclimatation. Les auteurs, ont également observé que l'exportation du carbone de la feuille vers le collet et les racines n'augmentait que partiellement. Pour prévenir les dommages causés par les dérivés ROS, les plantes synthétisent des antioxydants tels que le glutathion, l'ascorbate et la vitamine E ainsi que des enzymes de détoxification tels que la catalase et le superoxyde dismutase.



### 1.3.3 Synthèse d'osmo-protecteurs

Les osmo-protecteurs sont de petites molécules qui contribuent à la régulation de la pression osmotique dans les cellules et les tissus, sous l'effet de stress environnementaux. Durant l'acclimatation au froid, ils permettent d'augmenter la pression osmotique dans les cellules, et par là, l'abaissement de la température de cristallisation de l'eau et la réduction de la quantité de glace qui peut se former (Côme, 1992). Selon Hare *et al.* (1998), certaines molécules telles que la proline et la glycine bétaine constituent des osmo-protecteurs efficaces qui améliorent la résistance à la déshydratation. Ils contribuent aussi à la stabilisation des membranes plasmiques. Également, certains sucres tels que le raffinose agiraient comme un cryoprotecteur dans les plantes tolérantes au gel après acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000). Les fructanes dont l'accumulation a été mise en évidence au cours de l'acclimatation au froid chez l'avoine (Livingston et Henson, 1998) interagissent directement avec la membrane et la stabilisent en protégeant les phosphatidylcholines pendant la déshydratation due au gel (Hinch *et al.*, 2000). Gupta et Kaure (2005) ont rapporté que les plantes transgéniques exprimant les sucres tels que le fructane, le raffinose et le tréhalose, ont une meilleure résistance aux stress mais cependant leur croissance est affectée.

### 1.3.4 Synthèse de protéines cryoprotectrices

De nombreux travaux ont mis en évidence la présence d'une corrélation positive entre l'expression de gènes de certaines protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), chaperones, AFP (Antifreeze proteins) et l'adaptation au froid. Les protéines LEA sont des molécules hydrophiles qui sont généralement accumulées dans les graines pendant la maturation, et dans les tissus végétatifs exposés aux stress hydrique, salin et au froid

(Aberlanc-Bertossi *et al.*, 2006). Elles sont majoritairement composées d'acides aminés hydrophiles ordonnés en séquences répétées. Sur la base des similarités de séquences, les protéines LEA ont été divisées en cinq groupes. Les protéines du groupe 1, telles que la protéine Em (early methionine-labeled protein) possèdent le motif « Small Hydrophilic Plant Seed protein ». Les protéines du groupe 2 correspondent aux déhydrines (dehydration-induced proteins) et possèdent les motifs Y S K (Wise, 2003). Les protéines du groupe 3 possèdent des motifs répétés de 11 acides aminés qui forment des structures en hélices amphipathiques. Les protéines des groupes 4 et 5 formeraient également des hélices  $\alpha$  dans leurs parties N-terminales (Aberlanc-Bertossi *et al.*, 2006).

Chez le blé, l'accumulation des déhydrines WCS120 et WCOR410 à proximité des tissus vasculaires, a été corrélée avec la capacité de développer une tolérance au gel (Houde *et al.*, 1995; Danyluk *et al.*, 1998). Bien que leur mode d'action précis soit inconnu, il semblerait que ces protéines protègent les structures cellulaires et certaines molécules telles que les enzymes contre les dégâts causés par le gel. Par exemple la protéine du blé WCS120 à la concentration de 0.2  $\mu$ M est aussi efficace que 250mM de saccharose pour la cryoprotection de l'enzyme lactate déshydrogénase (Ouellet, 2007). Les chaperones sont d'autres protéines cryoprotectrices, qui participent à la stabilisation des protéines contre la dénaturation induite par le gel. Parmi elles, on retrouve les HSP (Heat Shock Protein) dont HSP100, HSP90, HSP70 et HSP60 (Wang *et al.*, 2003). Les AFP sont des protéines antigels qui s'accumulent dans l'apoplasme (espace intercellulaire). Elles ont une affinité avec la glace et ont pour rôle d'inhiber la croissance des cristaux de glace entre les cellules (Thomashow, 1998). Certaines protéines AFP ont été retrouvées chez les céréales telles que TaIRI-1 et TaIRI-2 (*Triticum aestivum* Ice Recrystallization Inhibition) (Tremblay *et al.*, 2005). Ces protéines sont retrouvées seulement chez les membres de la sous-famille des *Pooideae* et possèdent une structure bipartite typique. En effet, en plus du domaine de liaison à la glace dans la région C-terminale, ces protéines possèdent dans la région N-terminale un domaine formé de séquences répétées riches en leucine similaire aux protéines de type récepteur-like protéine kinase. Par ailleurs, en plus d'être induites par les basses températures, TaIRI-1 est aussi induite par l'éthylène et l'acide jasmonique impliqués dans les mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes.

#### 1.4 Régulation de l'expression des gènes dans la réponse au froid

Les nombreux processus biochimiques décrits précédemment sont induits lors de l'acclimatation au froid grâce à l'expression d'une multitude de gènes. Ces gènes peuvent être partagés en deux catégories. La première catégorie de gènes code pour des protéines qui vont protéger la plante contre les dommages du froid. Leur induction est lente de l'ordre de quelques heures après la perception du signal de stress. C'est le cas de nombreux gènes appelés communément gènes *COR* (Cold-Regulated).

Les données de localisation subcellulaire ont révélé que l'accumulation de ces protéines se fait dans les différents compartiments cellulaires incluant le cytosol, le noyau, et le voisinage des membranes plasmiques (Houde *et al.*, 1995; Danyluk *et al.*, 1998; Heyen *et al.*, 2002; Rorat *et al.*, 2004).

Par exemple, les gènes *Wcs410* codent pour des protéines associées à la membrane plasmique (Danyluk *et al.* 1998). *Wcor14*, *Wcor15*, *Wcs19* codent pour des protéines chloroplastiques du blé (Tsvetanov *et al.* 2000, Kobayashi *et al.*, 2004).

Chez le blé, la protéine WCS120 est localisée dans le cytoplasme et le noyau (Houde *et al.*, 1995). Chez le maïs, RAB 17 est aussi retrouvée dans le noyau et le cytoplasme (Goday *et al.*, 1994). PCA 60 du pêcher est retrouvé dans le cytosol, le noyau et aussi associée aux chloroplastes (Wisniewski *et al.*, 1999) et la protéine DSP 34 a été associée aux membranes thylacoïdales des chloroplastes des feuilles de *Craterostigma plantagineum* (Schneider *et al.*, 1993). Une autre étude a montré la présence de CAP 85 de façon prédominante chez

l'épinard dans le cytosol, mais aussi associée au réticulum endoplasmique (Neven *et al.*, 1993).

La deuxième catégorie, regroupe les gènes qui codent pour les facteurs de transcription. Ils ont pour rôle de réguler l'expression des gènes de la première catégorie. Leur induction est plus rapide, de l'ordre de quelques minutes tels que pour les gènes de la famille AP2/ERF (Gilmour *et al.*, 1998).

#### 1.4.1 Voies d'expression des gènes en réponse au froid

L'ABA (acide abscissique) est une hormone végétale qui est produite en conditions de déficit hydrique (Shinozaki *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2002). Elle semble jouer un rôle dans la tolérance de la plante à la sécheresse, à la salinité et au froid (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006). Les travaux de Shinozaki *et al.* (2003) et Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (2005), sur des plantes d'*Arabidopsis* de type sauvage et déficients (*aba*) ou insensibles (*abi*) à l'ABA, ont permis de mettre en évidence l'existence de deux voies de régulation de l'expression des gènes au froid. Une voie de régulation dépendante de l'ABA et une voie indépendante de l'ABA. Ainsi, les systèmes de régulation AREB/ABRE (ABA Responsive Element Binding Protein/ABA-Responsive Element) fonctionnent dans la voie d'expression des gènes ABA-dépendante (Thomashow, 1999). Les gènes *ABREs* portent au niveau de leur promoteur une séquence consensus C/TACGTGGC sur laquelle vont se lier les facteurs de transcription AREB1 et AREB2. Les gènes codant pour les protéines de liaison à l'ADN (AREB) sont eux même induits par l'ABA (Choi *et al.*, 2000).

Les autres systèmes de régulation qui sont ABA-indépendants, concernent majoritairement les protéines qui se lient aux motifs CRT/DRE (C repeat/Dehydration-Responsive Element) présents au niveau du promoteur des gènes de réponse au froid *COR*.

#### 1.4.2 Gènes *COR* et leur régulation

Les gènes *COR* sont similaires aux gènes *CS* (Cold Specific), *LTI* (Low Temperature Induced), *Kin* (Cold Inducible), *RD* (Responsive to Dessication), *ERD* (Early Dehydration-inducible) et *LEA* (Late Embryogenesis Abundant) (Thomashow, 1999). Ils s'expriment en réponse à la déshydratation, au froid et/ou à la salinité. De nombreux gènes de tolérance au froid ont été identifiés chez *Arabidopsis* : *RD29A*, *ERD7*, *ERD10*, *KIN1*, *LEA14*, *COR15a*, *LTI65* (Kimura *et al.*, 2003) ainsi que chez le blé : *WCS120*, *WCS19*, *WCOR410*, *WCOR14* (Houde *et al.*, 1992, Chauvin *et al.*, 1993, Danyluk *et al.*, 1994, 1998, Tsvetanov *et al.*, 2000) et l'orge : *blt101*, *blt4.9*, *blt14* (Pearce *et al.*, 1998).

Le motif DRE (TACCGACAT) présent au niveau du promoteur des gènes *COR* est reconnu par les protéines DREB1 et DREB2 (Dehydration Responsive Element Binding 1 et 2) (Stockinger *et al.*, 1997, Sakuma *et al.*, 2002). Il est composé de la séquence coeur CCGAC qui est le motif minimum de liaison pour une interaction spécifique (Hao *et al.*, 2002, Sakuma *et al.*, 2002). Les séquences CRT et LTRE (Low Temperature-Responsive Element) qui partagent le motif CCGAC avec l'élément DRE sont des variantes de celui-ci (Baker *et al.*, 1994 ; Jiang *et al.*, 1996 ; Thomashow, 1999). Ce motif est reconnu par les protéines CBF (CRT Binding Factor).

Les protéines CBF sont donc des facteurs de transcription qui se lient aux gènes *COR* et contrôlent leur niveau d'expression à basses températures. Ils appartiennent à la famille des facteurs de transcription AP2 (APETALA 2), et c'est par leur domaine AP2 qu'ils se lient à l'élément *cis* des gènes cibles (Stockinger *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Les protéines CBF ont été isolées à partir d'un grand nombre de plantes, y compris chez les espèces sensibles au froid tel que le riz incapable de s'acclimater. Ceci suggère que la voie CBF est largement

conservée chez les plantes même s'il existe des différences dans leur réponse au froid (Jaglo *et al.*, 2001).

### 1.4.3 Facteurs de transcription AP2

#### 1.4.3.1 Classification

Le domaine AP2 est composé de 68 acides aminés (Kim *et al.*, 2006). Il définit une large famille de protéines liant l'ADN, appelée AP2/EREBP (APETALA2/Ethylene Responsive Element Binding Protein) (Shigyo *et al.*, 2006). 144 gènes *AP2/EREBP* ont été identifiés dans le génome de la plante modèle *Arabidopsis* (Sakuma *et al.*, 2002). Ces auteurs les ont subdivisés en fonction des similitudes des domaines AP2, en cinq sous-familles : *AP2*, *RAV*, *ERF*, *DREB* et les non classifiés.

**Sous-famille *AP2* :** Les membres de cette sous-famille possèdent deux domaines de liaison AP2. On y trouve les protéines AP2, ANT (ANTEGUMENTA) et GL15 (Glossy 15), qui participent au contrôle de la floraison et qui interviennent dans le développement de la graine (Kim *et al.*, 2006).

**Sous-famille *RAV* :** Cette sous-famille est composée de six gènes chez *Arabidopsis*, dont *RAV1* et *RAV2*. Ils codent pour des facteurs de transcription avec deux domaines de liaisons différents AP2 et B3 (Sakuma *et al.*, 2002). La présence de ces deux domaines permet une grande affinité et une spécificité de liaison par rapport à la cible. En effet, Kagaya *et al.*



(1999) ont montré par la technique de gel à retardement que RAV1 se liait spécifiquement aux motifs CAACA et CACCTG respectivement par les domaines AP2 et B3.

**Sous-famille ERF (*Ethylene Responsive Factors*) :** Ce groupe de protéines se caractérise par la présence d'un seul domaine de fixation à l'ADN. Il a été démontré que la protéine ERF1 se liait spécifiquement à une séquence conservée AGAGCCGCC identifiée initialement dans les promoteurs de gènes codant pour des protéines PR (Pathogenesis Related Proteins) (Kitajima et Sato, 1999).

Les ERF sont régulés par une voie dépendante de l'éthylène, cependant un nombre de plus en plus croissant d'études décrivent la régulation des ERF par une variété de signaux tel que le jasmonate, l'ABA, le NaCl, l'acide salicylique, les blessures et les stress biotiques (Miranda, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2010).

**Sous-famille DREB :** Les gènes de cette sous-famille sont induits par un ou plusieurs stress environnementaux et leurs produits jouent un rôle dans la régulation de la tolérance aux stress abiotiques chez les plantes. Ils sont composés d'un domaine de liaison AP2. DREB1/CBF et DREB2, représentent les deux sous-groupes majeurs de facteurs de transcription intervenant dans la réponse au stress chez *Arabidopsis*. Les protéines DREB1/CBF interviennent dans l'acclimatation au froid, tandis que les protéines DREB2 interviennent dans la tolérance à la déshydratation et à la salinité (Medina *et al.*, 1999).

#### 1.4.3.2 Phylogénèse

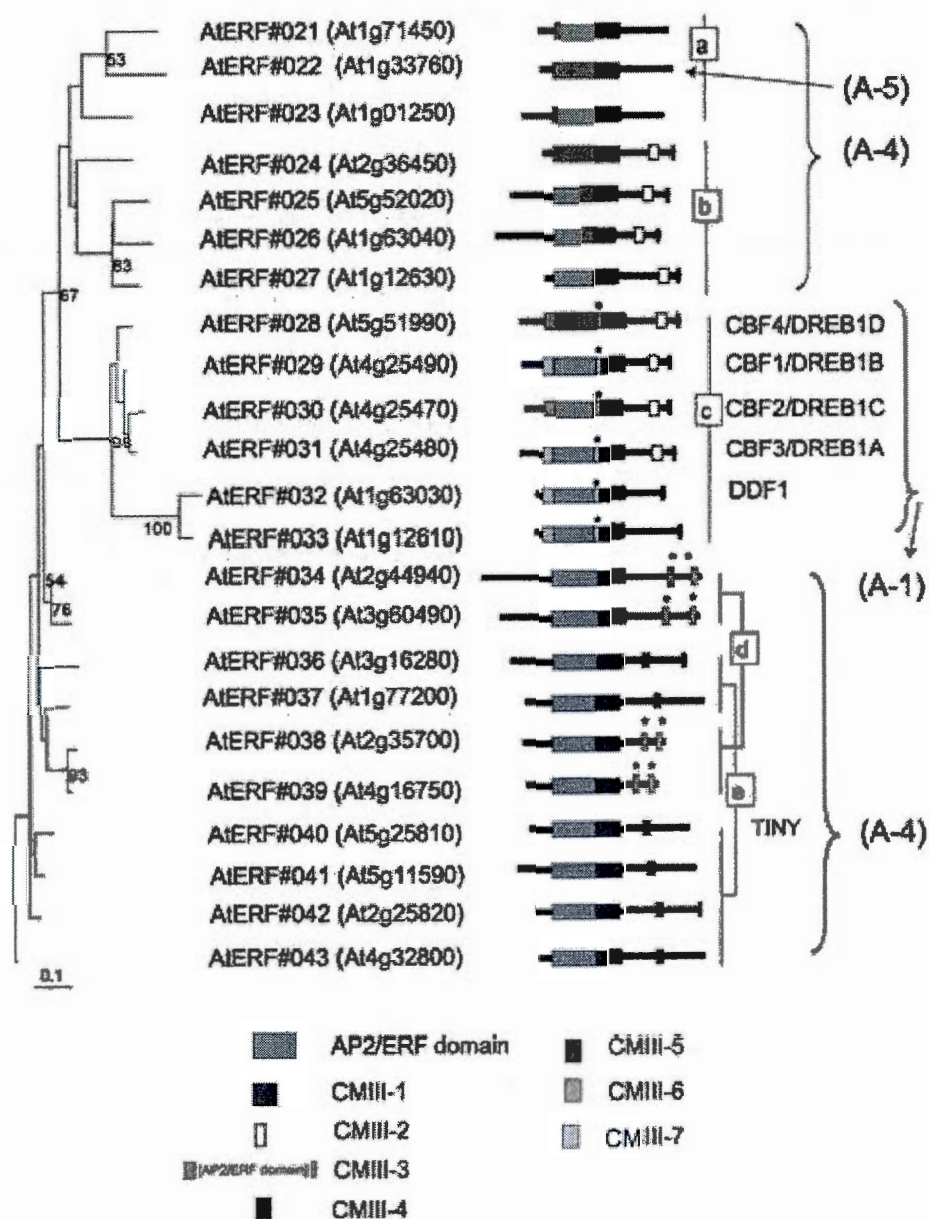
Le domaine AP2 était considéré spécifique aux plantes. Cependant, des homologues ont aussi été isolés chez certains micro-organismes : ciliés, cyanobactéries et virus (Shigyo *et al.*, 2006). Les protéines exprimées chez ces espèces sont des endonucléases caractérisées par un deuxième domaine HNH (résidus His, Asn et His) adjacent au domaine AP2. Les endonucléases HNH-AP2 sont capables de couper l'ADN double brin et d'y intégrer de nouvelles séquences. Magnani *et al.* (2004) ont émis l'hypothèse que des transferts d'endonucléases HNH portant le domaine AP2/ERF se seraient opérés des virus et des bactéries vers les plantes via les procédés de transposition et d'intégration. Les membres de la famille AP2 au sein des végétaux se seraient alors diversifiés par les phénomènes de duplication et de divergence (Kim *et al.*, 2006).

#### 1.4.3.3 Conservation des CBF chez les monocotylédones et dicotylédones

Tel que mentionné plus haut dans la classification, les CBF appartiennent à une large famille de facteurs de transcription nommée AP2/EREBP (ou AP2/ERF). Nakano *et al.* (2006) ont analysé les gènes de cette superfamille chez *Arabidopsis* et le riz et ont réalisé une étude comparative entre eux. Ils ont trouvé que la famille des ERF chez *Arabidopsis* et le riz était subdivisée en 12 et 15 groupes respectivement et que 11 groupes sont présents chez les deux espèces. En revanche, les groupes sont subdivisés en sous groupes et certains sont spécifiques. Basé sur ces résultats, il est déduit que la diversification fonctionnelle majeure au sein de la famille ERF s'est produite avant la divergence monocotylédones/dicotylédones. Selon la classification de Nakano *et al.* (2006), les six protéines CBF/DREB1 chez *Arabidopsis* sont incluses dans le sous-groupe IIIc partagé également avec le riz. Dans le groupe III, il existe cinq sous-groupes et ce qui différencie les protéines CBF des autres membres du groupe III



est que les CBF possèdent une séquence conservée d'acides aminés CMIII-3 (PKK/RPAGR<sub>x</sub>KF<sub>x</sub>ETRHP) (figure 1.1). Chez les CBF on retrouve trois autres motifs : CMIII-1(DSAWR), CMIII-2 et CMIII-4 (LWSY). Les motifs CMIII-3 et CMIII-1 entourent le domaine AP2 tandis que CMIII-2 et CMIII-4 se trouvent dans la région C-terminale. Ces trois derniers motifs sont présents dans un ou plusieurs sous-groupes III, ce qui a permis à Nakano et al. (2006) de suggérer l'existence d'une fonction moléculaire commune entre les différents membres du groupe III.



**Figure 1.1** Diagramme de la structure des protéines ERF du groupe III chez *Arabidopsis* et relation phylogénétique entre les différents gènes (de Nakano *et al.*, 2006). Seul les CBF possèdent le motif CMIII-3 autour du domaine AP2.

#### 1.4.4 CBF et leur rôle dans la tolérance au froid

##### 1.4.4.1 Chez *Arabidopsis*

Chez *Arabidopsis*, six CBF/DREB1 ont été isolés. Les premiers CBF caractérisés étaient CBF1, CBF2 et CBF3 aussi appelés respectivement DREB1b, DREB1c et DREB1a. Ils sont induits par le froid et disposés en tandem sur le chromosome 4 (Gilmour *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis*, CBF2 est un régulateur négatif de CBF1 et CBF3 (Novillo *et al.*, 2007). Le gène *AtCBF4* isolé plus tard, est induit en réponse à la déshydratation. Il est situé sur le chromosome 5 (Haake *et al.*, 2002). Les deux autres *AtCBF* nommés *AtDDF1* et *AtDDF2*, sont essentiellement induits par le stress salin. Ils sont situés sur le chromosome 1 (Magome *et al.*, 2004). En plus du domaine AP2, Wang *et al.* (2005) ont démontré que les 115 acides aminés de la partie N-terminale de CBF1 dirigent la protéine vers le noyau pour lier le gène *COR15*, de même que les 98 acides aminés de la partie C-terminale interviennent dans l'activation de la transcription. La méthode d'analyse des groupements hydrophobes (HCA) a permis à Wang *et al.* (2005) d'identifier dans la région C-terminale six régions hydrophobiques (HC1, HC2, HC3, HC4, HC5 et HC6). Ces groupements semblent très importants puisque chez les mutants HC3 et HC4, l'activation de la transcription a respectivement diminué vers 74% et 70% du niveau obtenu chez le type sauvage. Chez le triple mutant HC2/HC3/HC4, l'activité a diminué jusqu'à atteindre 7%. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont procédé à la substitution d'acides aminés dans la région C-terminale, et ont trouvé que la leucine en position 179 (L179) contribuait à elle seule à 20 % de l'activité transcriptionnelle totale.

#### 1.4.4.2 Chez les monocotylédones

Chez les monocotylédones, le nombre de gènes *CBF* varie selon les espèces. L'orge contiendrait au moins 20 gènes *CBF* (Skinner *et al.*, 2005), qui pourraient être subdivisés en 3 sous groupes *HvCBF1*, *HvCBF3* et *HvCBF4*. Chez le blé hexaploïde, Badawi *et al.* (2007) ont d'abord isolé 37 gènes, un nombre qui est passé à 65 gènes suite aux travaux d'identification de Mohseni (2011); Mohseni *et al.* (2012). Ces gènes représentent 27 groupes avec un à trois homéologues de chaque gène provenant des trois génomes du blé. Ils sont principalement regroupés sur le long bras du groupe de chromosomes 5 (Badawi *et al.*, 2007).

La reconstruction phylogénétique des *CBF* des monocotylédones réalisée dans l'étude de Badawi *et al.* (2007) a indiqué que les *CBF* sont classés dans 10 groupes monophylétiques (figure 1.2). Mohseni (2011); Mohseni *et al.* (2012) après avoir identifié plus de gènes chez le blé hexaploïde, a avancé que les *CBF* pourraient être subdivisés en 18 groupes. Ces groupes partagent une origine commune et des caractéristiques structurales semblables. Six des 10 groupes initiaux (IIIc, IIId, IVa, IVb, IVc et IVd) sont seulement retrouvés chez les Pooideae (Badawi *et al.*, 2007). Cet embranchement appartient à la famille des poaceae qui s'est ramifiée il y'a 55 à 70 millions d'années en plusieurs sous-familles (Kellogg 2001). On retrouve trois principales sous-familles: les pooideae qui comprennent un ensemble d'espèces des régions tropicales et sont connues comme étant sensibles au froid contrairement aux pooideae qui ont occupé les régions tempérées et qui ont la capacité de s'acclimater au froid.





L'étude de localisation avec les QTL (Quantitative Trait Loci) a permis d'associer les *CBF* à la tolérance de ces espèces au froid. En effet, chez le blé et l'orge, plusieurs gènes *CBF* ont été cartographiés sur le locus *Fr-2* (Båga *et al.*, 2007, Miller *et al.*, 2006, Skinner *et al.*, 2005). Knox *et al.* (2010) ont rapporté que *Fr-2* et *Fr-1* sont deux allèles qui affectent l'acclimatation et déterminent la tolérance au froid chez les céréales. Chez le blé diploïde (*Triticum monococcum*), le locus de tolérance au gel est situé sur le chromosome 5Am. Il est nommé *Fr-Am2* et contiendrait 11 gènes *CBF* (Miller *et al.*, 2006). Skinner *et al.* (2006) ont identifié 12 gènes *CBF* associés à la tolérance au froid sur le locus orthologue chez l'orge nommé *Fr-H2*. *Fr-2* est génétiquement et fonctionnellement lié à *Fr-1*, qui lui, est supposé être dû à l'effet pléiotropique de *VRN-1* (Knox *et al.*, 2010). *VRN-1* est un locus qui affecte le développement reproductif et la nécessité de vernalisation. L'allèle dominant *Vrn-1* est présent chez les céréales de printemps dont le blé, l'orge et le seigle (Dubcovsky *et al.*, 1998). Il est exprimé de façon constitutive chez ces espèces, ce qui conduit à une floraison rapide. Au contraire, les variétés d'hiver qui portent l'allèle récessif *vrn-1* marquent un retard dans l'accumulation des transcrits *VRN-1*. Ceci conduit à un prolongement de l'état végétatif chez ces espèces (Knox *et al.*, 2010). Plusieurs études ont révélé une association entre l'allèle d'hiver (*vrn-1*) et l'acclimatation, et entre l'allèle de printemps (*Vrn-1*) et la faible tolérance au froid (Limin et Fowler, 2006, Mahfoozi *et al.*, 2001). Dans les populations de croisements entre cultivars de printemps et cultivars d'hiver, *FR-1* (locus qui désigne le phénotype de résistance au froid) co-ségrège avec *vrn-1* (allèle d'hiver), ce qui indique que *VRN-1* agirait sur le caractère de tolérance au froid (Knox *et al.*, 2010).

*FR-2*, le deuxième locus de tolérance au froid et qui comporte des groupes de gènes *CBF*, se trouve à 30 cM à proximité de *VRN-1* (Knox *et al.*, 2010). Selon les travaux de Stockinger *et al.* (2007), il n'existe pas de différences qualitatives dans l'expression des *CBF* entre l'orge d'hiver Nure et l'orge de printemps Tremois. Les *CBF* sont exprimés dans les deux cultivars mais à des niveaux d'expression plus faibles chez Tremois.

Par exemple, le niveau des transcrits de *CBF2* et *CBF4* sont significativement plus élevés chez le cultivar d'hiver Nure que chez le cultivar de printemps Tremois (Knox *et al.*, 2010). Ceci a été expliqué par la présence de duplications en tandem de *CBF2A-CBF4B* chez Nure ce qui a aussi été vérifié chez un autre cultivar d'hiver, Dicktoo. Il s'agit d'un caractère transmis à la descendance (Knox *et al.*, 2010). Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont montré que chez Dicktoo et Nure, la séquence codante de *CBF13* est intacte tandis que chez Tremois, elle contiendrait plusieurs codons non-sens et serait un pseudogène. Chez *T. monococcum*, le gène *CBF12* de la lignée de printemps DV92 contient une délétion de cinq acides aminés dans le domaine de liaison à l'ADN AP2 ce qui rend la protéine *CBF12* chez cette lignée incapable de lier les gènes cibles. Au contraire, l'allèle chez le cultivar d'hiver G3116 (tolérant au froid) code pour une protéine capable de lier la séquence des gènes cibles (Knox *et al.*, 2008). Fricano *et al.* (2009) ont rapporté qu'une perte de variabilité génétique de 4 *CBF* d'orge (*HvCBF3*, *HvCBF6*, *HvCBF9* et *HvCBF14*) serait survenue de façon naturelle chez les variétés cultivées en Europe suite à la domestication de l'orge depuis les variétés d'orge sauvage et la forme ancestrale. En effet, comparé aux gènes de *H. spontaneum*, *HvCBF3*, *HvCBF6* et *HvCBF9* ont subi une perte de polymorphisme nucléotidique de 46, 24 et 89% respectivement. Par ailleurs, les analyses moléculaires n'ont pas permis de détecter les gènes *HvCB9* et *HvCBF3* chez de nombreux cultivars d'orge européens. Ces études montrent qu'entre cultivars, il existe des délétions de gènes *CBF* ou des mutations dans la séquence nucléique des *CBF* qui pourraient changer le caractère de la plante vis-à-vis de sa tolérance au froid.

Badawi *et al.* (2007) ont analysé les régions du domaine de liaison AP2 chez les CBF. Ils ont trouvé que le nombre et la position des groupements hydrophobes (HC) des CBF du groupe I, sont relativement bien conservés dans divers groupes (Poales, Arecales et Zingibérales). Toutefois, des différences significatives existent chez les autres groupes de CBF (groupes II, III et IV). Concernant la conservation de la fonction générale du domaine AP2, la surexpression du gène *OsDREB1A* du riz chez *Arabidopsis* (Dubouzet *et al.*, 2003) a induit la

surexpression des gènes *COR* et a permis un gain de tolérance au gel, à la sécheresse et à la salinité. Cependant, contrairement à DREB1a, il semblerait que les protéines OsDREB1A se lient préférentiellement au motif GCCGAC et faiblement au motif ACCGAC. Chez l'orge par exemple, HvCBFI-1 se lie préférentiellement au motif CRT/DRE TTGCCGACAT (Xue, 2002), tandis que HvCBFIVa-2 préfère le motif YYGTCGACAT (Xue, 2003). Ces préférences de liaison des CBF aux séquences de l'ADN peuvent être à l'origine de différences fonctionnelles entre les groupes CBF, notamment en contrôlant des groupes spécifiques de gènes *COR*.

L'expression des *CBF* est rapide après l'exposition au froid et peut être influencée par plusieurs facteurs. Badawi *et al.* (2007) en analysant les transcrits *CBF* chez deux cultivars de blé (d'hiver et de printemps) acclimatés, sont arrivés à plusieurs résultats. Ils ont démontré dans un premier temps par des essais d'hybridations sur ARN que 11 *CBF* (des 15 testés) sont induits par les basses températures et qu'ils atteignent leur maximum d'expression après 4h et 6h d'exposition. Des tests plus précis par PCR quantitative en temps réel leur ont permis de quantifier l'expression initiale des *CBF* chez les deux cultivars et ce, sous deux conditions de température (20°C et 4°C) et de lumière (le jour et la nuit). Les résultats ont indiqué que l'accumulation des *TaCBF* se fait après seulement 2 heures d'exposition au froid mais semble aussi être influencée par la période du jour. Les gènes *CBF* des groupes *CBFII*, *CBFIIIa* et *CBFIIIc* s'expriment de façon similaire chez les deux cultivars, tandis que ceux des groupes *CBFIIId*, *IVa*, *IVb*, *IVc* et *IVd* à l'exception de *CBFIVd-D9* sont plus fortement exprimés chez le blé d'hiver que chez le blé de printemps. Par ailleurs, l'expression de certains *TaCBF* (groupe *CBFIV* et deux du groupe *CBFIIId*) chez Norstar exposé à 20°C a montré une fluctuation diurnale. En effet, l'expression était maximale entre 14h et 22h et minimale entre 24h et 12h indiquant que les *CBF* chez le blé sont influencés par le cycle circadien. Enfin, il a été remarqué que trois des groupes corrélés avec la tolérance au gel (*CBFIVa*, *IVb*, et *IVc*) ne contiennent qu'un nombre restreint de *CBF* (2, 2 et 1 membres respectivement) comparativement aux groupes *CBFIIId* et *IVd* qui contiennent 5 et 4 membres, respectivement. Ceci indique que certains gènes ont un rôle déterminant dans la fonction de leurs groupes. Aussi, tous les gènes analysés de ces groupes montrent un profil



d'expression transitoire à l'exception de *CBFIIIId-B12* qui est le seul à démontrer une expression stable voire une augmentation après 8 heures d'exposition au froid.

#### 1.4.5 Régulation en amont des gènes *CBF*

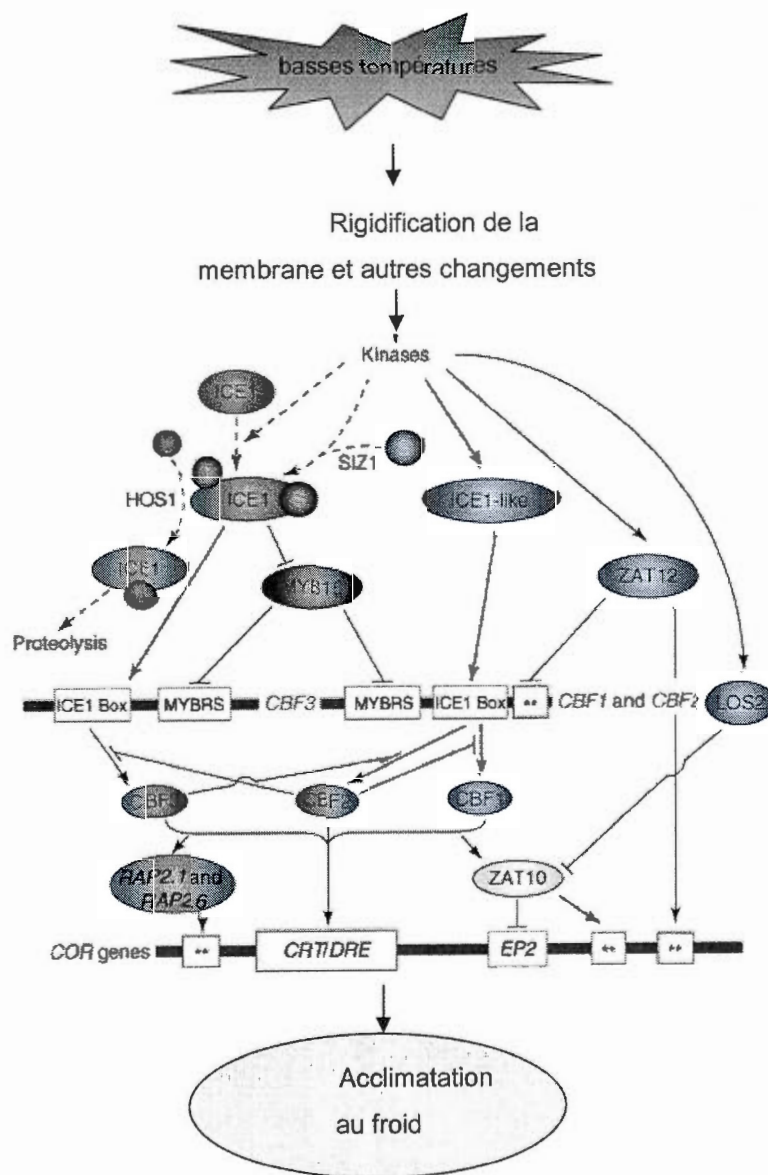
Pour que les mécanismes de tolérance au froid soient mis en place, le signal de froid doit d'abord être perçu par la plante puis transmis dans la cellule afin de réguler les gènes appropriés. Il semble que le changement de l'état de fluidité de la membrane joue un rôle essentiel dans la perception du stress à travers la modulation de l'influx du calcium (Thomashow, 1999). Les fluctuations dans les niveaux de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  sont alors perçus par des groupes de protéines calcium-dépendantes tels que calmoduline et des kinases CDPK (calcium dependent protein kinases) qui sont phosphorylées. Ces protéines participent à la régulation des gènes induits par le froid en modulant les interactions avec l'ADN ou avec d'autres protéines (Monroy et Dhindsa, 1995).

Les événements suivant la cascade de signaux jusqu'à l'induction des gènes *CBF* sont encore peu connus. La description des premiers éléments chez *Arabidopsis* a révélé l'implication de facteurs de transcription agissant sur les membres de la famille des *CBF*. Ainsi, ICE1 (Inducer of *CBF* expression 1) est une protéine qui appartient à la famille de facteurs de transcription MYC (type bHLH : basic helix loop helix) qui active l'expression de *CBF3* en réponse au froid (Chinnusamy *et al.*, 2003). Selon Gilmour *et al.* (1998), *ICE1* est exprimé de façon constitutive et sous une forme inactive dans les tissus. Ces auteurs ont avancé l'hypothèse que ICE serait séquestré dans le cytoplasme par une protéine qui le régule négativement, ou se trouve sous une forme qui ne lui permet pas de lier l'ADN ou d'activer efficacement la transcription. ICE 1 devient par la suite actif sous l'effet des basses températures (Gilmour *et al.*, 1998). L'activité de ICE1 est régulée négativement par *HOS1*,

une ubiquitine E3 ligase qui entraîne sa protéolyse (Dong *et al.*, 2006). Chez le blé hexaploïde, deux gènes *ICE* (*TaICE 41* et *TaICE 87*) codent pour des activateurs potentiels de la transcription des *CBF* (Badawi *et al.*, 2008). Lorsque ces gènes sont surexprimés chez *Arabidopsis*, ils entraînent l'augmentation de l'expression de *AtCBF2* et *AtCBF3* et par conséquent augmentent la tolérance au gel. ZAT12 et MYB15 sont des régulateurs négatifs des *CBF* chez *Arabidopsis* (Vogel *et al.*, 2005, Agarwal *et al.*, 2006). Cependant *MYB15* est à son tour régulé négativement par *ICE1* (Agarwal *et al.*, 2006) (Figure 1.3).

#### 1.4.6 Spécificité d'expression des gènes en réponse au stress

Plusieurs études portées sur l'expression des gènes *COR* et l'accumulation de leurs protéines, ont démontré l'existence d'une expression différentielle entre les tissus de la plante, et il se trouve que certains de ces gènes appartiennent au régulon de *CBF*, ce qui rend leur expression dans l'espace très étroitement liée. Par exemple, les *WCOR410* du blé s'accumulent préférentiellement dans la région de transition vasculaire des racines, des feuilles et du collet (Danyluk *et al.*, 1998). De même, la famille de protéine *WCS120* chez le blé est essentiellement localisée dans la zone de transition vasculaire des tissus du collet des plantes acclimatées au froid (Houde *et al.*, 1995). Kobayashi *et al.* (2004) ont rapporté que *WCOR14*, *WCOR15* et *REP14* sont spécifiquement retrouvés dans les feuilles où ils codent pour des protéines chloroplastiques. Toutefois dans leurs essais, ces auteurs n'ont comparé que les feuilles et les racines du blé. *Wcs120* et *Wcor14* possèdent des éléments CRT/DRE au niveau de leur promoteur et sont activés par les facteurs de transcription *CBF* (Shen *et al.*, 2003, Kobayashi *et al.*, 2005).



**Figure 1.3** Schéma des principales voies de régulation dans l'expression des gènes en réponse au froid (de Chinnusamy *et al.*, 2007).

Ganeshan *et al.* (2008) ont démontré chez le blé que les gènes *Wcor410*, *Wcor14* et *Wcs120* sont exprimés dans les feuilles et dans le collet, cependant avec une expression différentielle entre ces organes. Ils ont noté que l'accumulation des transcrits de ces trois gènes était fortement liée au nombre de jours d'acclimatation. Chez Norstar, une forte accumulation des transcrits *Wcs120* et *Wcor14* a été enregistrée après 2 jours d'exposition au froid dans les feuilles et le collet, cependant après 7 jours, il y a eu une réduction de près de 50% dans les feuilles. Ces auteurs ont par ailleurs observé que *Wcor410* présentait un profil d'expression plus comparable à *Wcs120* et *Wcor14* dans les feuilles que dans le collet.

L'expression différentielle des gènes est aussi liée au génotype. Ceci a été prouvé par plusieurs auteurs. Winfield *et al.* (2010) ont mené une étude du transcriptome par la technologie des micropuces Affymetrix sur trois variétés de blé exposées au froid et dans deux types de tissus : les feuilles et le collet. Ils ont noté des changements globaux dans l'abondance des transcrits qui était nettement différente entre les feuilles et le collet et entre les variétés d'hiver (Harnesk et Solstice) et la variété de printemps (Paragon). Ainsi, suite à une expérience d'acclimatation graduelle au froid, Winfield *et al.* (2010) ont noté que chez la variété Harnesk 4572 gènes sont régulés dans les feuilles comparé à 1329 dans le collet. Chez Solstice, ils ont noté la variation dans l'expression de 3845 gènes dans les feuilles comparée à 927 gènes dans le collet. Chez la variété de printemps Paragon, les résultats étaient différents. Un changement plus important a été noté dans le collet avec 2356 gènes transcrits par rapport à 620 gènes dans les feuilles. Une minorité de gènes régulés par le froid était commune aux feuilles et aux collets. On déduit de ces études que la régulation des gènes en réponse au froid est complexe et répond à des fonctions physiologiques liées à plusieurs facteurs qui restent inconnus dans la majorité des cas.

Chez *Arabidopsis* et d'autres espèces, des différences d'accumulation dans les parties de la plantes ont été démontrées sous l'effet de stress environnementaux tels que la sécheresse, les basses températures ou la salinité. Les gènes *COR* dont les déhydrines restent largement les plus étudiées. ERD 14 et LTI 29, qui sont d'abord localisés dans la pointe des

racines et les tissus vasculaires dans les conditions normales de croissance chez *Arabidopsis*, sont induits dans les cellules de tous les tissus de la plante soumise au froid (Nylander et al., 2001). Des résultats similaires ont été obtenus pour la distribution de DHN 24 chez *Solanum sogarandinum* (Rorat et al., 2006) et P-80 chez *Hordeum vulgare* (Bravo et al., 1999) acclimatés au froid. D'autres déhydrines tel que LT 130 chez *Arabidopsis* n'ont pas été détectées dans les plantes poussées dans des conditions normales de croissance mais se sont accumulées sous les conditions de froid dans tous les tissus de la racine, dans les tissus vasculaires de la tige, des feuilles, des fleurs ainsi que dans les sacs de pollen (Nylander et al., 2001). RAB 18 est une déhydrine qui n'est pas induite par les basses températures mais par l'ABA exogène. Elle s'accumule dans les cellules de garde des stomates (Nylander et al., 2001). Les protéines DSP 14 et DSP 16 chez *Craterostigma plantaginum* ont été détectées dans les graines, les racines et les feuilles en conditions normales de croissance. Chez les plantes soumises à une déshydratation par la chaleur, ces protéines étaient présentes dans tous les types de cellules, mais préférentiellement dans les éléments du tube du phloème des feuilles et les cellules embryogènes des graines (Schneider et al., 1993). Une autre déhydrine, TAS 14 de *Lycopersicum esculentum* a été faiblement détectée dans les plantes contrôles, mais chez les plantes soumises au stress salin elle s'accumule fortement dans les racines primordiales en développement, les cellules corticales et vasculaires des tiges, et dans les feuilles (Godoy et al., 1994).

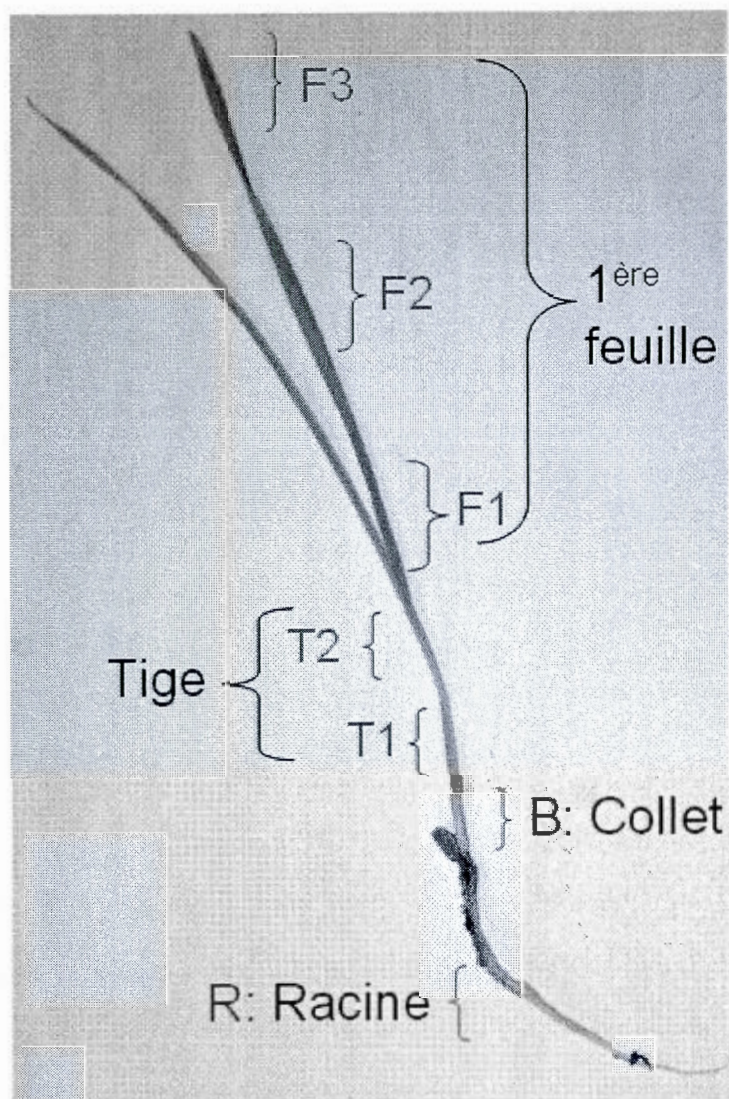
## CHAPITRE II

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1 Matériel végétal

Des graines de blé d'hiver (*Triticum aestivum* cultivar Wonder) ont été germées dans un mélange de terre noire et de vermiculite (50:50) et sous une photopériode de 16 heures de lumière ( $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et 8 heures d'obscurité. La température a été maintenue à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  et le taux d'humidité à  $75 \pm 5\%$ . Après une semaine, les plants ont été transférés vers 10h dans la journée à un incubateur réglé à  $4^\circ\text{C}$ , avec une photopériode de 16 heures de lumière ( $125 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et un taux d'humidité de 75%. Les plantes ont été maintenues pendant 4h et 28h dans ces conditions et différents types d'explants ont été utilisés. Les prélèvements sont faits vers 14h de la journée, l'heure où selon les résultats de Badawi et al. (2007), l'expression des CBF est maximale et plus ou moins stable pendant les 2 heures qui suivent. Pour l'hybridation *in situ*, les prélèvements ont été effectués après 4h d'exposition au froid. Pour la technique de northern blot, les prélèvements ont été effectués après 4h et 28h d'exposition au froid. Des explants de 1 cm ont été rapidement prélevés. Sept types d'explants ont été utilisés : racine (R), collet (B), partie proximale (T1) et distale (T2) de la tige, et les tiers proximal, moyen et distale (F1, F2 et F3) de la première feuille (Figure 2.1).





**Figure 2.1** Plantule de blé (*Triticum aestivum* cv Wonder) agée d'une semaine avec les différentes parties de la plante prélevées pour l'extraction des ARN, et les coupes histologiques. R, racine; B, collet; T1, tige proche du collet; T2, tige proche de la feuille; F1, feuille proche de la tige; F2, milieu de la feuille- F3, extrémité de la feuille



Les zones de jonction ont été évitées entre les différents explants. Les tissus ont été aussitôt fixés dans du paraformaldéhyde froid pour l'hybridation *in situ* ou congelés à -80°C pour l'extraction d'ARN.

## 2.2 Préparation des sondes

Des oligonucléotides spécifiques aux gènes *CBF* (tableau 1) ont été fabriqués à partir des données de séquences (Badawi et *al.*, 2007, Mohseni, 2011, Mohseni et *al.*, 2012) en utilisant le logiciel Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen et Skaletsky, 2000). Ces oligonucléotides délimitent une région de 100-200 bases situées préférentiellement dans les régions non codante du gène *CBF*. La spécificité des sondes a été validée en utilisant une comparaison BLASTN (<http://www.proweb.org/proweb/Tools/WU-blast.html>) contre tous les autres *CBF*. Chaque fragment d'ADN spécifique a d'abord été amplifié par PCR, puis inséré dans le vecteur pCR®-Blunt II-TOPO® pourvu de deux promoteurs spécifiques d'ARN polymérase T7 et SP6. Ces promoteurs servent à la transcription du brin sens et antisens des gènes d'intérêt.

Les plasmides recombinants ont ensuite été transformés dans des bactéries compétentes. Celles-ci ont été par la suite sélectionnées sur un milieu LB-agar-kanamycine et les plasmides ont été extraits par miniprep. Cette technique repose sur le principe de la lyse alcaline des bactéries puis la séparation de l'ADN plasmidique de l'ADN chromosomique par centrifugation. 1,4 ml de culture bactérienne ont été centrifugés 1 min à 14000 rpm. Le culot a d'abord été resuspendu avec 100 µl de solution P1 (50 mM Tris-HCl à pH 8.0, 10 mM EDTA à pH 8.0, 100 µg/ml ARNase) puis ont été ajoutés 100 µl de solution P2 (0.2 M NaOH,

1 % SDS) afin de lyser les bactéries. Les tubes ont été mélangés par inversion quelques secondes. Enfin ont été ajoutés 400 µl d'un mélange composé de 25% d'une solution P3 (3 M potassium acetate, 2 M acide acétique glacial) et de 75% d'une solution de Binding (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM EDTA pH 8,0, 6 M guanidine-HCl). Les tubes ont été incubés 10 min sur glace puis centrifugés 10 min à 14000 rpm. Entre temps, des colonnes avec 400 µl de terre à diatomées étaient préparées. Brièvement, 2 g de terre à diatomées ont été suspendu dans 40 ml d'eau et on a laissé sédimenter pour 2 heures pour enlever les plus petites particules. Ceci a été répété une deuxième fois et la terre ainsi lavée a été suspendu dans 40 ml d'eau.

Les surnageants ont été récupérés et placés dans les colonnes et centrifugés 1 min à 5000 rpm. Les colonnes ont été lavées avec 600 µl de solution de lavage (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8,0, 200 mM NaCl, 58% d'éthanol) pour 1 min à 5000 rpm et ensuite séchées par centrifugation. L'élution des plasmides a été réalisée avec 50 µl de TE 0,1X (1 mM Tris HCl, pH 8,0, 0.1 mM EDTA, pH 8,0). L'ADN récupéré a été ensuite séquencé au Centre d'Innovation Génome Québec (Université McGill, Canada) pour déterminer l'orientation, et conservé à -20°C.

Pour la transcription des brins sens et antisens, les plasmides ont été digérés par l'une ou l'autre des enzymes de restriction BamHI et XhoI, qui coupent respectivement au niveau des promoteurs/régions T7 et SP6. Des ARN polymérases SP6 et T7 ont alors été utilisées en présence de nucléotides et d'une proportion d'UTP-digoxigénine pour synthétiser les sondes ARN selon le protocole du manufacturier (ROCHE). Cette méthode de marquage permet de révéler les sondes hybridées aux transcrits à l'aide de l'anticorps antidigoxigénine (Roche).

**Tableau 2.1** Amorces utilisées pour la fabrication des sondes *CBF*, utilisées pour les expériences northern et hybridation *in situ*.

Groupe	Nom	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence	Longueur des fragments (nt)
CBF I	A11	EF028751	F1: GGCCTGGCCTTCATGGCTCACT R1: ATCGCCCGTGCGAGTGCTATCT	166
	1	JN987191	F1: TGATTACGCGCATTTGAGTTACGAAGA R1: GATCGCAATTCATCAGAGAGAACCATACA	152
CBF II	5.2	EF028753	F1: GCTTCTCGATTGGGCCATTCTTCATC R1: TTTGCATTCCCGTTCTCTCTCTGCTT	168
CBF IIIa	6.1	EF028755	F1: AGCTAGCTAGTTCGCGCCAGTTTCG R1: TAAGCCATGCTCTGTTTCCCAATTC	157
CBF IIIc	B10	EF028761	F1: CCGATTCTGCTTTTGTGTTGACTCTGTAGC R1: CAGTGGCATAAACTGTGTCATAATGAATGCTC	181
CBF III d	12.1	EF028762	F1: TGATGACACCGAGCGGGGACT R1: GTGCACCGGCGCCTATCACTG	150
	A15	EF028764	F1: ATGCATGGAACAAACCGAAGCTGTTC R1: TCATCAAGCAGCGATGTCCTTTCGT	155
	B19	EF028767	F1: CGCCGGCCTCTGGAGCTACT R1: CGTTCCAAACTCCGATTTTATTATGCTTGG	121

CBF IVb	A20	EF028772	F1: TCCTAGACTACTAGTGGTTGTGTTTCGTCCAAA R1: CATCCCTGCAAATAGAAACCGGAAGC	112
	21.1	EF0287751	F1: CGCTGCTATGGTAAAGTTTATAGTTGGCTCTG R1: TTCTTTATTACAGAACACGCAAGTGCAA	175
CBF IVc	14.1	EF028777	F1: CCACCAAATATGGGAGGAAACAGAAGG R1: AGAACACTCAAGTGATTCAACTCAACAACAAAA	178
CBF IVd	A22	EF028785	F1: AGGGGATTCGCCTTCTTCCTGATTG R1: GATATGGATTCTGGAGTGCACGATGT	185
	9.1	EF028782	F1: TGTCAAGTTGTAGATAGTCGCCTTCTCTCG R1: CGCACTCGAGTTCAGTACCAATAATTTCTGT	153

## 2.3 Northern blot

### 2.3.1 Extraction des ARN

Dans un mortier, 3g de tissus correspondant à chaque type d'explant et à une durée d'exposition au froid de 4h ou 28h ont été broyés avec de la glace sèche, puis homogénéisé avec 30 ml de solution TRIzol (Invitrogen). Cette solution contient de l'isothiocyanate de guanidium et du phénol, qui permet de dénaturer les acides nucléiques et de dissocier les protéines.

Le mélange a été gardé 5 minutes à température ambiante puis centrifugé 10 minutes à 12000g et à 4°C. Au surnageant ont été ajouté 3 ml de chloroforme-isoamyl (49 :1). Le mélange a été agité rigoureusement puis centrifugé 15 minutes à 12000g et à 4°C. L'ARN de la phase aqueuse a été précipité avec un volume égale d'isopropanol en gardant 5 à 10 minutes à température ambiante puis en centrifugeant 8 minutes à 12000g. Le culot a été lavé avec 10 ml d'EtOH 75% puis centrifugé 5 minutes à 7500g. L'ARN a été solubilisé avec 10 ml d'eau déionisée, et re-précipité en ajoutant 1 ml d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'EtOH 100%. La solution a été agitée, gardée 10 minutes à -20°C puis centrifugée 5 minutes à 12000g. Le culot a été resuspendu dans 10 ml de sodium acétate 3 M (pH 5) puis gardé pour la nuit à -20°C. L'échantillon une fois décongelé a été centrifugé 15 minutes à 15000g puis le culot a été lavé avec 1,5 ml d'EtOH 75% et centrifugé. Le culot a été séché à température ambiante puis resuspendu dans 200 à 1000 ul d'eau déionisée. L'absorbance des échantillons à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm a été mesurée afin de déterminer respectivement la quantité d'ARN et le degré de pureté. Le rapport  $DO_{260}/DO_{280} \geq 1,8$  indique que l'ARN est de bonne qualité et non contaminé par les protéines.

### 2.3.2 Préparation du gel ARN et de la membrane

7 ug d'ARN total extrait correspondant à chaque échantillon ont été séparés sur un gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Il s'agit d'un gel d'agarose 1,5% (p/v) préparé avec 0.1 volume de MOPS 10X (0,2 M MOPS, 50 mM NaAcétate, 10 mM EDTA, pH 7) et 18% (v/v) de formaldéhyde. Par ailleurs, 15,6 ul du mélange (200 ul de formamide, 70 ul de formaldéhyde, 40 ul de MOPS (10X) et 2 ul de bromure d'éthidium (10 mg/ml)) ont été ajouté à l'ARN (dans un volume de 4,5 ul). Les échantillons ont été chauffés 10 à 15 min à 60 °C et placés sur glace avant d'être migré (à raison de 20 ul par puits) sur le gel. À l'issue de la migration, le gel a été pris en photo puis lavé deux fois 45 minutes dans du 20 X SSC



(NaCl 3 M, citrate de sodium 0,3 M, pH 7,0). Les fragments d'ARN ont été par la suite transférés par capillarité sur une membrane en nylon chargée positivement (ROCHE). La membrane a été préalablement rincée à l'eau déionisée puis au 20 X SSC. Après une nuit de transfert, la membrane a été rincée à l'eau déionisée afin d'éliminer l'agarose et les sels qui s'étaient accrochés. Les ARN ont ensuite été fixés de façon covalente par les UV pendant 3 minutes.

### 2.3.3 Détection des ARN par hybridation avec les sondes

Les membranes ont d'abord été humidifiées avec de l'eau déionisée puis placées dans des cylindres adaptés à l'incubateur rotatif. 5 ml de solution de préhybridation (0,25 M  $\text{NaPO}_4$  (pH 7,2), 0,25 M NaCl, 2 mM EDTA (pH 8), 7% SDS et 50% formamide) ont été ajoutés dans chaque flacon, puis gardés dans l'incubateur 30 minutes à 60°C. Les sondes marquées ont été dénaturées par chauffage à 100°C pendant 5 minutes et immédiatement refroidies dans la glace. 200-400ng de sonde ont été ajoutés à 4 ml de la solution d'hybridation chauffée à 60°C. L'hybridation a été effectuée dans l'incubateur à rotation pour la nuit entre 48°C et 55°C en fonction de la richesse des sondes en GC.

Les membranes ont été lavées afin d'éliminer la sonde non spécifiquement appariée. Plusieurs lavages successifs ont été réalisés d'abord à l'aide du 2 X SSC, 0,1% SDS pendant 5 minutes, suivi par 4 lavages de 15 minutes avec du 0,1 X SSC, 0,1% SDS à 68°C. Les membranes ont été lavées 5 minutes avec le tampon acide maléique (0,1 M acide maléique, 0,15 M de NaCl, 0,3% Tween, pH 7,5) à température ambiante, puis avec 20 ml de tampon acide maléique contenant 0.1 volume de réactif de blocage 10X (Roche) pendant 30 minutes. Ensuite, 20 ml de ce dernier tampon additionnés de 1ul de l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) a été rajouté à la membrane. Les membranes ont été incubées

pendant 30 minutes avec l'anticorps puis rincées 4 fois pour 15 minutes avec le tampon acide maléique. Pour la détection, les membranes ont été pré-équilibrées avec le tampon de détection (0,1 M Tris HCl, 0,1 M de NaCl, pH 9,5), puis ont été bien égouttées et placées entre deux films plastiques avec quelques gouttes (5 à 6) de CDP Star (Roche). Les membranes ont été par la suite analysées à l'aide de l'appareil Fusion X Fx7 de Biotech Inc qui permet la détection des ARN par chimiluminescence. L'exposition avait varié entre 2 minutes et 1 heure en fonction de l'abondance des transcrits.

## 2.4 Hybridation *in situ*

### 2.4.1 Fixation et préparation des tissus

Les tissus prélevés ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA 4% (p/v), 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM NaCl, 0,06% de tween 20, pH 7,5) sous vide (sur glace) dans un dessiccateur pendant un maximum de 2h. Lorsque les tissus ont bien été infiltrés par le PFA et étaient tombés au fond du tube, le vide a été arrêté et la fixation était poursuivie durant la nuit à 4°C. Les tissus ont ensuite été déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes, puis incubés dans du Ter-Butanol (Sigma) à 30°C et infiltrés avec de la paraffine (Paraplast X-TRA) à 58°C. Cette dernière opération a été renouvelée matin et soir pendant 2 jours. Les explants ont finalement été inclus dans la paraffine (Paraplast X-TRA) pour former des blocs, puis conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Des coupes tissulaires d'une épaisseur de 10  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Les rubans de tissus ont été déposés sur la surface de l'eau distillée chauffée à 45°C, puis sur des lames de microscopes (Superfrost Plus, VWR International). Les sections ont été séchées à 37°C pour la nuit avant l'hybridation des sondes.



#### 2.4.2 Hybridation des sondes

Après déparaffinage des tissus par du substitut de xylène et réhydratation graduelle par une série d'éthanol dilué jusqu'à l'eau distillée, les lames ont été plongées dans une solution 2X SSC pendant 10 minutes. À la solution d'hybridation composée de : 50% formamide, 2X SSC, 1 mM EDTA (pH 8,0), 1X solution Denhardt', 100 ng/μl d'ADN dénaturé, 100 ng/μl d'ARNt de levure et 10% sulfate de dextran, ont été rajoutés 0,3 ng/μl de sonde sens ou antisens (T7 ou SP6). Les mélanges d'hybridation ont été chauffés à 80°C pendant 10 min, puis refroidis avant d'être étalés sur les tissus. Les lames ont été couvertes délicatement d'une lamelle puis incubées à 50°C pour la nuit dans des boîtes humides contenant 50% formamide dans du 2X SSC. Après une nuit d'incubation, les lames ont d'abord été rincées dans du 2X SSC pour retirer les lamelles, puis lavées 2 fois une heure dans du 2X SSC et 0.1XSSC à 62°C.

Pour la détection immunologique des hybrides, les lames ont été lavées pendant 5 minutes dans du tampon DIG 1X (100 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) à température ambiante suivi d'une incubation dans le même tampon additionné de 1% de réactif bloquant (Roche). Après 30 minutes, une dilution de 1‰ dans du tampon de blocage (DIG) d'un anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline (Roche) a été appliqué à chaque lame. Les lames ont été gardées pendant 2 heures dans une atmosphère humide et à la température ambiante et lavées dans du tampon DIG 1X. Enfin pour la réaction enzymatique, les lames ont d'abord été incubées 5 minutes dans une solution composée de 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, et 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Ceci fournit un tampon de concentration en sel et de pH adéquat pour le développement de la coloration (Viaene et al., 1997). Les tissus ont par la suite été incubés pour la nuit à 30°C et à l'obscurité, dans le milieu réactionnel de la phosphatase alcaline composé du dernier tampon additionné de 10% de PVA (polyvinyl alcool) ainsi que de 1,68 μg/ml de NBT et de 0,65 μg/ml de substrat BCIP. La coloration des tissus a été stoppée par un tampon contenant 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) et 1 mM EDTA (pH 8) pendant 10 minutes. Finalement, les lames ont été lavées 10 minutes dans l'eau distillée puis additionnées de quelques gouttes de CC/Mount et placées à 70°C, 10 à 15 minutes. Une fois refroidies, des lamelles ont été montées avec quelques gouttes de Permount pour l'observation des tissus sous microscope.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1 Analyse de l'expression des *CBF* par northern blot

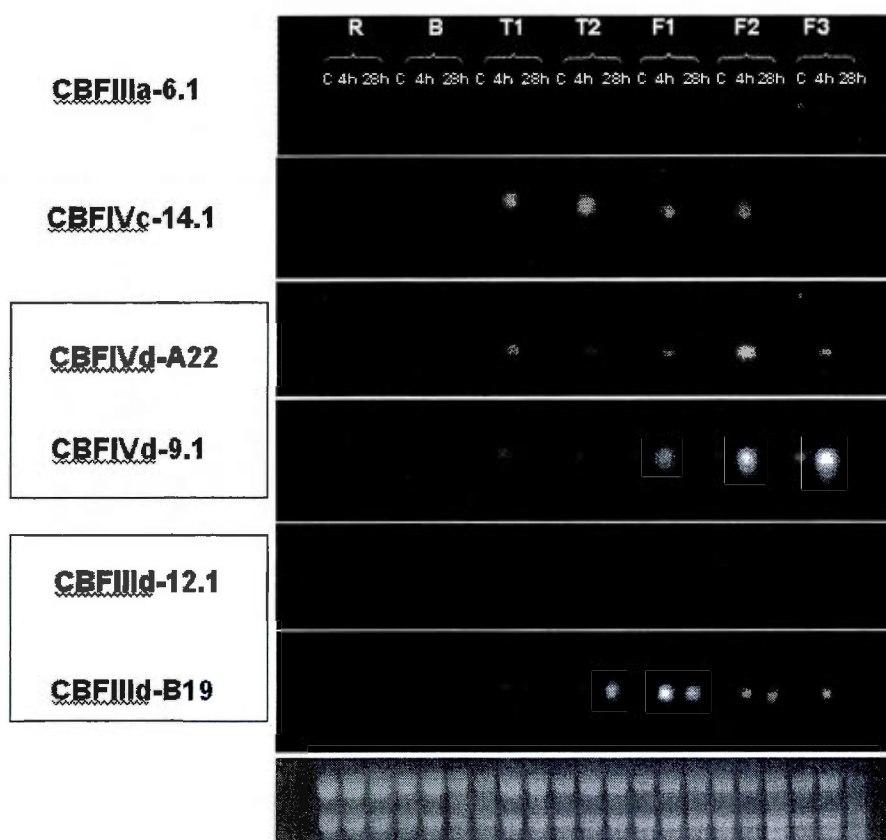
L'analyse des transcrits *CBF* chez le blé a été réalisée par northern blot sur des ARN totaux extraits des divers organes de la plante (racines, collets, tiges et feuilles) soumise à deux conditions de température (20°C et 4°C) et de durée d'exposition au froid (4h et 28h). L'efficacité de la méthode repose dans un premier temps sur la qualité des ARN extraits. L'extraction des ARN est très délicate car les ARN sont sensibles à l'action des ribonucléases qui même présentes en petites quantités sont capables de dégrader l'ARN. C'est pourquoi des précautions particulières doivent être prises lors de l'extraction telle que l'utilisation de vaisselles propres et d'eau déionisée. Par ailleurs, chaque sonde nécessite plusieurs manipulations préliminaires afin d'optimiser l'hybridation avec le transcrit notamment par le choix des températures d'hybridation et de lavage adéquates.

Dans des travaux antérieurs, notre équipe a déterminé le niveau d'expression de plusieurs *CBF* du blé en utilisant toute la partie aérienne de la plante (Badawi *et al.*, 2007). À

partir de ces résultats, il nous semblait intéressant pour notre études de choisir d'une part des paralogues suffisamment exprimés afin de préciser la partie de la plante où ils sont le plus exprimés. D'autre part notre choix a porté sur des *CBF* faiblement exprimés qui grâce à l'utilisation de petites parties de la tige (T1, T2) et de la feuille (L1, L2, L3) va permettre d'augmenter leur concentration dans les échantillons et de les détecter.

La technique de northern blot n'a pas permis de détecter les transcrits de tous les *CBF* sélectionnés. En effet aucun signal n'a été détecté pour les transcrits *CBFI-A11*, *CBFI-1*, *CBFII-5.2*, *CBFIIIc-B10*, *CBFIIId-A15*, *CBFIVd-21.1* et *CBFIVb-A20*. Leur expression semble très faible dans la plante et des méthodes plus sensibles telles que la PCR quantitative en temps réel (RT PCR) est recommandée. Dans notre cas, il a été impossible de faire des RT PCR à cause du coût élevé de la technique.

Les profils d'expression des gènes *CBFIIId-6.1*, *CBFIIId-12.1*, *CBFIIId-B19*, *CBFIVc-14.1*, *CBFIVd-9.1* et *CBFIVd-A22* dans les différentes parties de la plante (voir figure 2.4 pour la localisation des régions R, B, T1, T2, F1, F2 et F3) et dans les conditions de 20°C et 4°C pour 4 h, et 4°C pour 28 h sont rassemblés dans la figure 3.1. Les transcrits des gènes *CBF* retenus ont été détectés dans la majorité des parties du blé mais avec une variation dans l'intensité de l'expression entre les organes. Globalement, on a noté une forte abondance dans les feuilles par rapport au collet, et une quasi absence dans les racines. Par ailleurs des variations d'accumulation des transcrits ont été enregistrées entre les plantes exposées 4 h et 28 h au froid. *CBFIIId-6.1* est exprimé de façon constitutive et seulement dans les feuilles. Son expression a diminué après 4 h d'exposition au froid sauf dans la partie distale de la feuille (F3). Son expression disparaît au bout de 28 h. L'accumulation des transcrits *CBFIIId-6.1* n'est pas augmenté par le froid, en effet il appartient au groupe *CBFIIId* qui regroupe un ensemble de *CBF* retrouvés chez les espèces incapables de s'acclimater tel que le riz (Figure 1.2). *CBFIVc-14.1* après 4 h d'exposition au froid, est fortement exprimé dans la tige (T1 et T2) suivi de près par les parties F1 et F2 de la feuille et ensuite un peu moins dans la partie la plus mature F3. Le plus bas niveau d'expression est observé dans le collet



**Figure 3.1** Profils d'expression des *CBF* dans les différents tissus de plantes de blé de 7 jours exposées au froid. R, racine; B, collet; T1, tige proche du collet; T2, tige proche de la feuille; F1, feuille proche de la tige; F2, milieu de la feuille- F3, extrémité de la feuille. C, plantes contrôles de 4 h à 20°C; 4h, plantes exposées 4 h à 4°C; 28h, plantes exposées 28 h à 4°C. 7 ug d'ARN totaux extraits des différents explants de blé ont été séparés sur un gel d'agarose en conditions dénaturantes. Les hybridations ont été faites avec des sondes dessinées aux extrémités externes du domaine AP2. La détection des transcrits a été faite par chimiluminescence. La visualisation du gel sous UV permet de voir les deux bandes d'ARN ribosomiaux 18 S et 28 S.

(B). L'expression de *CBFIVc-14.1* a diminué après 28 h d'exposition au froid dans la tige (T1 et T2) et dans les deux premières parties de la feuille (F1 et F2). Elle disparaît totalement dans le collet (B) et dans l'extrémité de la feuille (F3). Aucun signal n'est pratiquement détecté dans le contrôle.

L'analyse des profils d'expression des deux gènes du groupe *CBFIVd* (*CBF-A22* et -*9.1*) montre qu'ils sont exprimés à 20°C et à 4°C, et cette expression est surtout évidente dans les tiges et les feuilles. Néanmoins, l'expression des deux gènes est augmentée par le traitement de 4 h au froid, puis nettement diminuée par la suite. Le signal disparaît dans les feuilles au bout de 28 h de traitement au froid. De plus, ces gènes montrent une accumulation plus élevée des transcrits au niveau des feuilles (F1, F2 et F3). Les deux gènes *CBF-A22* et *CBF-9.1*, bien qu'appartenant au même groupe, ont des profils d'expression différents tel que, *CBF-9.1* est exprimé dans la racine contrairement à *CBF-A22*. Ceci indique que même à l'intérieur d'un groupe, les gènes *CBF* peuvent avoir des fonctions différentes, ici en occurrence c'est la régulation spécifique de la réponse au froid chez les racines par *CBFIVd-9.1*. Par ailleurs, la présence des transcrits même à 20°C suggère leur implication possible dans les premiers mécanismes de réponse au froid lors de baisse soudaine de température.

La figure 3.1 montre des profils d'expression différents pour les transcrits *CBF-12.1* et *CBF-B19* du groupe *CBFIId*. En effet, à 4 h d'exposition au froid, le niveau d'expression de *CBF-12.1* est très faible dans le collet et la tige mais un peu plus dans les feuilles (F1, F2 et F3). L'expression de ce gène n'est pas détectable après 28 h d'exposition au froid. *CBF-B19* est lui aussi très faiblement induit dans le collet mais semble être fortement exprimé dans la partie la plus jeune de la feuille (F1) et dans la partie T2 de la tige. Par ailleurs, on a noté que *CBF-B19* présente une expression stable dans le temps étant exprimé après 28 h d'exposition au froid. Ceci est un autre exemple indiquant que même à l'intérieur d'un groupe, les gènes *CBF* peuvent avoir des profils d'expression spécifique suggérant des fonctions différentes.

En résumé, ces résultats montrent que 5 des 6 gènes analysés sont positivement régulés par le froid, deux gènes démontrent une spécificité tissulaire (*CBFIIIa-6.1* est spécifique aux feuilles et *CBFIVd-9.1*, le seul des 6 à être exprimé dans les racines), les gènes *CBFIVd-A22*, *CBFIVd-9.1* et *CBFIIIc-12.1* sont préférentiellement exprimés dans les feuilles tandis que *CBFIVc-14.1* et *CBFIIIc-B19* sont préférentiellement exprimés dans les tiges (T1 et T2) ou dans la partie jeune de la feuille (F1).

### 3.2 Hybridation *in situ* (HIS)

L'hybridation *in situ* est une autre alternative pour étudier l'expression des gènes. Elle permet de localiser l'accumulation des transcrits dans les cellules et les tissus et donc de vérifier notre hypothèse et démontrer l'existence d'une spécificité d'expression des gènes *CBF*. Le principal intérêt de l'hybridation *in situ* est qu'elle s'effectue sur des coupes histologiques apportant ainsi des informations précises sur la localisation des ARNm contrairement au northern blot qui s'effectue sur des homogénats de tissus. Nous avons tenté dans un premier temps de reprendre toutes les sondes disponibles, cependant cet objectif s'est avéré laborieux et difficile à atteindre à cause des contraintes rencontrées au cours des manipulations. En effet l'une des contraintes majeures dans la technique était de préserver au mieux l'intégrité des tissus pendant les étapes d'hybridation et de révélation. Par ailleurs, lors de l'analyse microscopique des lames, il a été difficile dans plusieurs cas de même détecter un marquage et dans d'autres cas un marquage spécifique par les sondes.

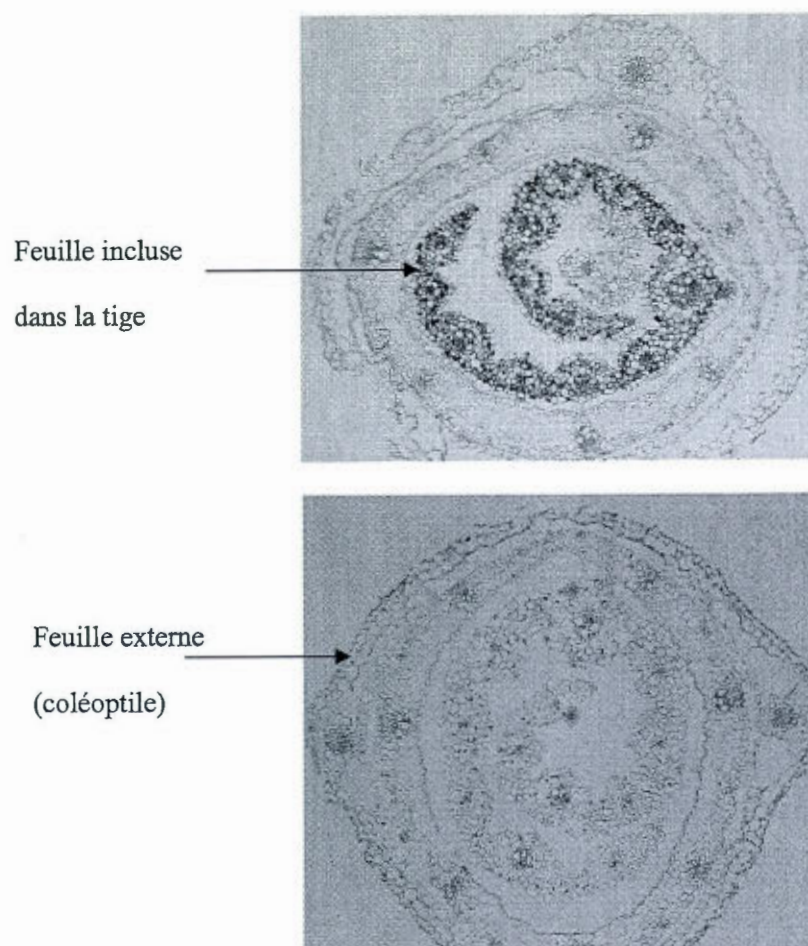
Ainsi, dans le cas des transcrits *CBFI-A11*, *CBFII-5.2*, *CBFIIIa-6.1*, *CBFIVb-21.1* et *CBFIVc-14.1* aucun signal reproductible évident n'a pu être noté dans tout type de tissus confondu. Ceci est principalement dû à leur faible abondance et à l'intégrité des tissus qu'il était difficile de sauvegarder. Dans le cas des transcrits *CBFI-1*, *CBFIIIc-B10*, *CBFIIIc-B19*, *CBFIVd-A22* et *CBFIVb-A20*, un signal quasi uniforme a été enregistré entre les sondes sens et anti-sens. Bien que les sondes ont été vérifiées et validées par northern blot, ces résultats



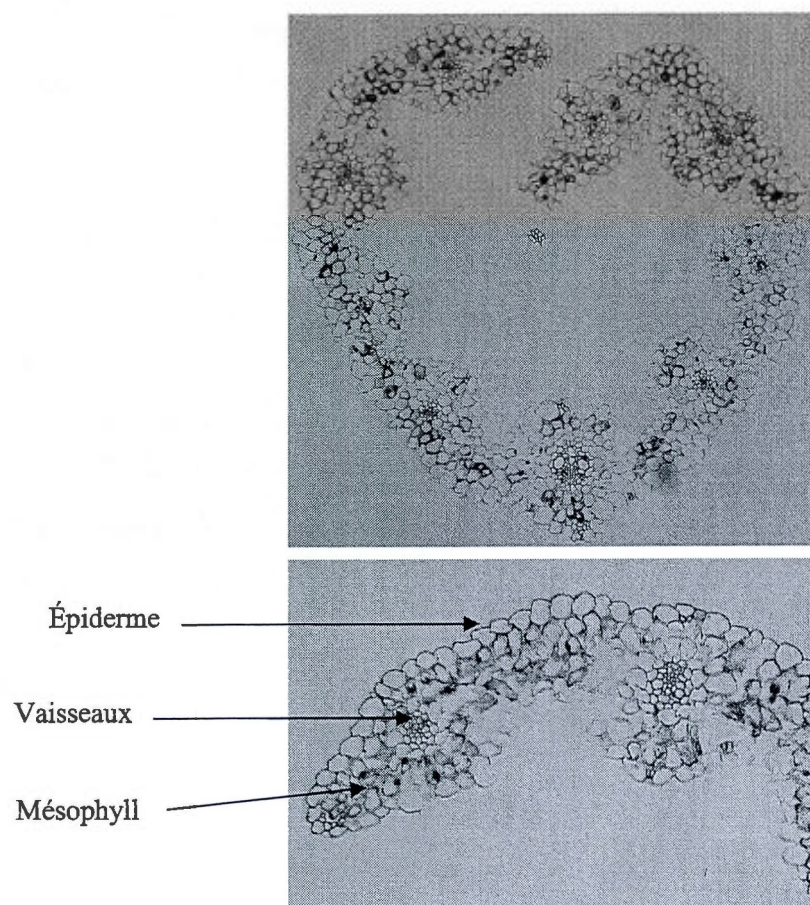
nous amènent à reconsidérer le protocole. Il est à noter que les solutions d'hybridation et températures sont différentes pour ces deux techniques et oblige à optimiser séparément l'hybridation *in situ*. L'optimisation future consistera à effectuer une série de contrôles dans les différentes étapes de l'hybridation *in situ*. Par exemple, l'omission de la sonde, le remplacement de la sonde spécifique par une sonde comparable (de même taille ou de pourcentage GC), l'omission d'une étape de révélation. Par ailleurs, pour modifier le rapport signal/ bruit de fond, il serait intéressant de vérifier l'étape de fixation, l'étape d'hybridation (composition du tampon d'hybridation, température d'hybridation) et de lavage (température, concentration saline, durée). Mon travail n'a pas couvert l'optimisation de la technique de l'hybridation *in situ* vu le temps passé à établir le profil d'expression des CBF par la méthode de northern blot et à faire des minipréparation de plasmide pour un autre projet du laboratoire (voir appendice).

Dans nos conditions d'hybridation et de lavage, l'hybridation *in situ* nous a permis de démontrer l'existence de différences d'expression entre deux gènes du groupe CBFIIIId : *CBF-12.1* et *CBF-A15* (Figure 3.2). On a observé un marquage spécifique des transcrits de *CBF-12.1* au niveau de la jeune feuille incluse dans la tige (T1) du blé acclimaté contrairement à *CBF-A15* où aucun signal n'est détecté à ce niveau. Pour ce dernier, il est possible de voir un marquage faible dans la feuille la plus externe entourant les feuilles internes (Figure 3.2 b). De même dans la feuille (F2), *CBF-12.1* est fortement exprimé dans le mésophylle (figure 3.3), tandis que *CBF-A15* n'est pas exprimé dans le mésophylle mais plutôt dans l'épiderme (figure 3.4).

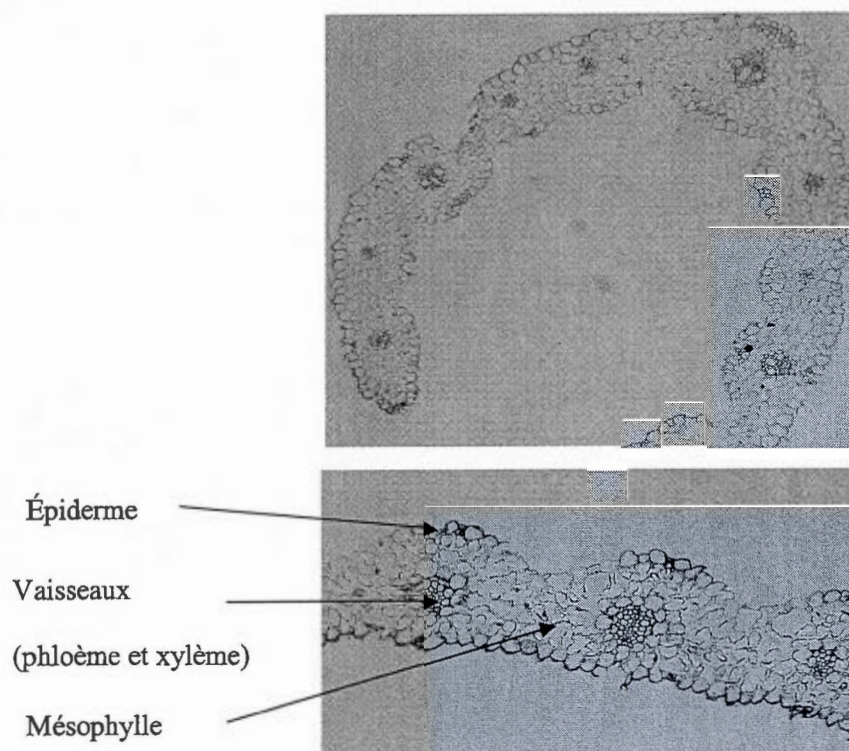




**Figure 3.2** Coupes transversales dans la tige du blé exposé 4 h à 4°C et hybridées avec les sondes anti-sens CBFIIIId-12.1(a) et CBFIIIId-A15 (b)



**Figure 3.3 Coupes transversales dans la feuille (F2) du blé exposé 4 h à 4°C et hybridées avec la sonde anti-sens CBFIIIId-12.1. Les structures et types cellulaires sont indiqués dans la figure montrant le grossissement**



**Figure 3.4** Coupes transversales dans la feuille (F2) du blé exposé 4 h à 4°C et hybridées avec les sondes anti-sens *CBFIIIId-A15*. Les structures et types cellulaires sont indiqués dans la figure montrant le grossissement.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Les *CBF* représentent une famille de gènes impliqués dans le mécanisme de tolérance de la plante au froid. Badawi *et al.* (2007), Mohseni (2011) et Mohseni *et al.*, (2012) ont identifié 27 gènes *CBF* chez le blé qui ont été classés originalement dans 10 groupes phylogénétiques distincts démontrant des différences structurales. Une analyse plus approfondie a rapporté que plusieurs de ces groupes pourraient encore être subdivisés pour refléter les différences structurales observées (Mohseni, 2011). Ceci donnerait chez le blé hexaploïde une classification des *CBF* dans 18 groupes. Ces différences structurales sont détectées au niveau ou autour de la structure du domaine AP2, et/ou au niveau du domaine d'activation dans la région C-terminale. Ceci suggère que les *CBF* du blé pourraient avoir des propriétés et des fonctions différentes. Ces fonctions peuvent se traduire par une expression spécifique dans les parties de la plante, par des liaisons spécifiques à l'ADN, ou par des interactions/transactivation spécifiques avec d'autres molécules.

Dans cette étude, nous avons vérifié la spécificité de l'expression des *CBF* en évaluant les profils d'expression de ces gènes dans toutes les parties végétatives du blé (racines, collets, tiges et feuilles). En général, les rapports sur les profils d'expression génique au cours de l'acclimatation au froid ont été menés essentiellement sur les gènes *COR* et sur les ARN extraits à partir des feuilles (Jaglo *et al.*, 2001), des feuilles et des racines (Ohno *et al.*, 2001, Kobayashi *et al.*, 2004), des feuilles et du collet (Ganeshan *et al.*, 2008, Winfield *et al.*, 2010) du collet seulement (Stockinger *et al.*, 2007, Sutton *et al.*, 2009) ou de toute la partie aérienne



de la plante (Monroy *et al.*, 2007, Badawi *et al.*, 2007). Pour notre part, on a inclus toutes les parties de la plante afin d'associer plus finement le rôle de certains CBF avec des tissus ou types cellulaires spécifiques. Ceci permettra d'avoir une idée plus complète des mécanismes moléculaires induits lors de l'acclimatation au froid.

Les tests d'hybridation par northern blot et hybridation *in situ* réalisés sur les 13 gènes *CBF* ont montré d'une part l'existence d'une large gamme de niveaux et profils d'expressions caractéristiques et d'autre part que l'expression de certains *CBF* n'a pu être analysée. En effet les *CBFI-A11*, *CBFI-1*, *CBFII-5.2*, *CBFIIIc-B10*, *CBFIVd-21.1* et *CBFIVb-A20* n'ont pas pu être détectés car ils étaient faiblement exprimés dans nos conditions expérimentales. Chez ces *CBF*, aucun signal n'a été détecté malgré les différentes tentatives à changer les conditions d'hybridation et de lavage (composition de la solution d'hybridation, températures d'hybridation, nombre et durée des lavages) et malgré l'analyse de petits segments de feuilles et de tiges afin d'accroître la sensibilité de l'analyse. Plusieurs hypothèses décrites dans les deux prochains paragraphes peuvent être émises pour comprendre ces résultats.

Dans l'étude précédente, Badawi *et al.* (2007) n'avaient pas détecté les gènes *CBFI-A11* et *CBFIIIc-B10* par northern blot et par PCR quantitative en temps réel chez plusieurs cultivars de blé. De même, Winfield *et al.* (2010) dans leurs essais utilisant les micropuces Affymetrix Gene Chip pour mesurer l'expression des gènes durant l'acclimatation au froid chez trois variétés de blé (Harnesk, Paragon et Solstice) n'ont observé aucune réponse pour les *CBFII-5*, *CBFIIIc-B10* et *CBFIIId-15*. Ces auteurs avancent que ces *CBF* pourraient être impliqués dans des voies de régulation autres que le froid, avoir une expression rapide et passagère inférieure à 2h après l'exposition aux basses températures ou être contrôlés de façon non-transcriptionnelle. En effet, certains *CBF* sont régulés par d'autres facteurs. Une régulation par le cycle circadien a été démontrée pour les *CBF* des groupes *CBFIVa*, *CBFIVb*, *CBFIVc*, *CBFIVd* et les gènes *CBFIIId-15* et *CBFIIId-A19* durant la croissance du blé Norstar à 20°C (Badawi *et al.* 2007), ainsi que chez *Arabidopsis* pour *CBF2* et *CBF3* à 22°C (Harmer *et al.*, 2000). Fowler *et al.* (2005) ont étendu ces résultats et ont indiqué que

les niveaux d'accumulation des *CBF 1, 2 et 3* en réponse au froid chez *Arabidopsis* sont dépendants de l'heure de la journée où les plantes sont exposées au froid et que cette réponse est régulée par l'horloge circadienne. Le maximum d'accumulation pour les trois *CBF* a été enregistré très tôt le matin au ZT4 (Zeitgeber time) et le minimum en début de soirée au ZT16. Franklin et Whitelam (2007) de leur côté ont trouvé que la régulation des *CBF* était influencée par la qualité du signal lumineux (le ratio rouge/rouge lointain) perçu et relayé par les phytochromes et cryptochromes. Selon les résultats de Jurczyk *et al.* (2011), les niveaux de transcription de *CBF6* chez la Fétuque des prés (*Festuca pratensis*) étaient plus importants à l'obscurité qu'aux lumières rouge, bleue et blanche aux deux températures de 4°C et 15°C. Par ailleurs, *CBF4* chez *Arabidopsis* est induit en réponse à la déshydratation (Haake *et al.*, 2002), de même que les deux autres *AtCBF* nommés *AtDDF1* et *AtDDF2* sont essentiellement induits par le stress salin (Magome *et al.*, 2004).

Les facteurs comme le degré d'expression transitoire et la demi-vie des messagers pourraient aussi influencer la détection des transcrits. Zarka *et al.* (2003) ont remarqué que les *CBF 1,2,3* chez *Arabidopsis* transféré de 4°C vers une température plus chaude avaient une demi-vie de seulement 7,5 min. Cette demi-vie courte rend la méthode d'analyse des transcrits très sensible au temps requis entre le prélèvement et la fixation du tissu pour l'hybridation *in situ*. En conséquence, la quantité de certains transcrits dans les tissus devient faible et du coup plus difficile à détecter. Cette propriété de demi-vie courte (ou expression transitoire extrême) est également observée en condition de froid. En analysant les résultats de PCR quantitative en temps réel pour l'expression des *CBF* chez le blé Norstar obtenus par Badawi *et al.* (2007), *CBFIIIc-D3* qui est fortement exprimé après 2h d'exposition au froid, diminue de 90% après 2 h supplémentaires au froid. Cette propriété est observée chez certains *CBF* du groupe *CBFIII* mais pas chez ceux du groupe *CBFIV* et du groupe *CBFII*.

L'analyse de l'expression des *CBFIIIa-6.1*, *CBFIIIb-12.1*, *CBFIIIb-B19*, *CBFIIIb-A15*, *CBFIVc-14.1*, *CBFIVd-9.1* et *CBFIVd-A22* a permis d'enregistrer plusieurs types de réponses telle que la réponse transitoire, l'expression constitutive à 20 °C ainsi qu'une spécificité

d'expression tissulaire et cellulaire. La réponse transitoire est traduite par une expression rapide des *CBF* lorsque la plante est exposée au stress. Ce type de réponse est important pour les *CBF* étant donné leur rôle de régulation conduisant à des changements physiologiques et morphologiques dans la plante. Liu *et al.* (1998) et Gilmour *et al.* (2004) ont trouvé que la surexpression constitutive des *CBF1*, *CBF2* et *CBF3* chez *Arabidopsis* causait le nanisme de la plante avec un ralentissement de la croissance et un retard dans la floraison. Selon Achard *et al.* (2008), ces symptômes seraient dûs à la diminution des niveaux de l'hormone de croissance gibbérelline et de l'accumulation de la protéine DELLA causée par la surexpression de *CBF1*. Afin d'avoir une idée sur la longévité de l'expression de ces gènes dans le temps, deux périodes d'exposition au froid (4 h et 28 h) ont été testées. On a noté que l'expression transitoire des *CBFIIIa-B19* et *CBFIVc-14.1* était prolongée jusqu'à 28 h. Stockinger *et al.* (2007) dans leur étude de l'expression des transcrits chez l'orge, ont trouvé que les *CBF* étaient essentiellement exprimés entre 4 h et 12 h d'exposition au froid. L'expression des *CBF6*, *CBF12* et *CBF14*, était fortement diminuée après 27 h d'exposition, où seulement des traces de leur présence ont été détectées sur les membranes. *CBF9* et *CBF4*, pour leur part, étaient restés plus ou moins exprimés jusqu'à 75 h. Ces différences de durée d'expression des *CBF* indiquent un contrôle fort de l'expression et sous-entendent l'existence de signaux de régulation précis.

L'expression constitutive a été enregistrée pour les *CBFIVd-9.1*, *CBFIVd-A22* et *CBFIIIa-6.1*. Ce type de réponse a été observé et rapporté par plusieurs auteurs (Fowler et Thomashow, 2002; Novillo *et al.*, 2004; Gilmour *et al.*, 2004; Vagujfalvi *et al.*, 2005; Badawi *et al.*, 2007). Xue (2003) et Skinner *et al.* (2005), ont cependant rapporté que les *CBF* appartenant aux groupes *CBFIV* auraient la propriété de devenir biologiquement active seulement lors d'une baisse de température. Dans notre cas, la réponse des deux gènes (*CBF-9.1*, *CBF-A22*) du groupe *CBFIVd* est notablement augmentée à 4°C. On pourrait penser à leur implication dans la réponse immédiate au stress froid. Ils reflètent par là une stratégie de tolérance différente, en adoptant une régulation précoce et complémentaire aux *CBF* des autres groupes. Concernant *CBFIIIa-6.1* dont l'expression n'est pas augmentée par le froid. Winfield *et al.* (2010), ont trouvé que suite à l'acclimatation, ce gène était régulé



négativement chez le blé d'hiver et le blé de printemps. Par ailleurs, selon la classification phylogénétique des *CBF* chez les monocotylédones de Badawi *et al.* (2007), *CBFIIIa-6.1* fait partie d'un groupe composé de gènes appartenant aux trois sous-familles des Poaceae dont les Oryzaceae, avec principalement le riz qui est sensible aux basses températures. De plus, l'expression de ce gène n'était pas associée avec la capacité des cultivars de blé à développer la tolérance au froid (Badawi *et al.* 2007).

En résumé, une hypothèse peut être émise concernant l'expression des *CBF* étudiés. Ainsi, les *CBFIVd-9.1* et *CBFIVd-A22* sont constitutifs et sont exprimés dans les conditions normales de croissance. Il est possible qu'ils contribuent à pallier au changement brutal de température. Pendant ce temps, le blé répond au stress en régulant l'expression transitoire des *CBFIIIId-12.1*, *CBFIIIId-B19*, *CBFIVc-14.1*, *CBFIVd-9.1* et *CBFIVd-A22*. Enfin certains *CBF* (*CBFIIIId-B19* et *CBFIVc-14.1*) restent exprimés dans la plante au delà de 28h possiblement afin d'assurer une protection prolongée et optimale de la plante.

Il est bien établi que les *CBF* jouent un rôle majeur dans la configuration du transcriptome aux basses températures et le conditionnement de la tolérance au gel (Thomashow, 2010), mais la question qui reste posée est : est-ce que tous les *CBF* ont la même fonction? Novillo *et al.* (2004) dans leurs essais ont conclu que chez *Arabidopsis*, la fonction de *CBF2* est différente de celle de *CBF1* et de *CBF3*. *CBF2* serait un régulateur négatif des deux autres gènes. Par ailleurs, Badawi *et al.* (2007) et Mohseni (2011) ont démontré la présence de différences dans la structure secondaire prédite des *CBF* qui pourraient affecter leurs propriétés et activités biologiques. Dans notre cas, nous avons détecté une spécificité d'expression spatiale et/ou temporelle. Les résultats de northern blot ont montré que les *CBF* analysés ont présenté d'une part une expression spécifique à certains organes de la plante et d'autre part une large gamme de niveaux d'expression observée avec le reste des transcrits étudiés. Ceci nous a amené à poser plusieurs questions : pourquoi seul *CBFIVd-9.1* sur l'ensemble des gènes analysés était exprimé dans les racines? Et pourquoi les *CBF* s'exprimeraient moins dans le collet? Y a-t-il d'autres mécanismes protecteurs à ces

parties de la plante? Par ailleurs, pourquoi des gènes s'exprimeraient plus dans les feuilles voire seulement dans cet organe pour *CBFIIIa-6.1*? Plus encore, on a noté des différences dans les niveaux d'expression entre les parties jeunes et matures de la feuille. Y aurait il une relation avec le fait que les bouts des feuilles, sous l'effet d'un stress lié au froid, se nécrosent et se dessèchent en premier? Il est possible que ces différences indiquent que la transcription des *CBF* est dépendante du type d'organe mais aussi du stade de croissance des tissus.

Tyree et Sperry (1989) ont rapporté que le stress lié au froid causait dans la plante un phénomène appelé cavitation et embolisme. En fait, lorsque la disponibilité de l'eau devient limitée par la sécheresse ou par la formation de glace, l'air est tiré vers le xylème (ensemble des vaisseaux qui transportent la sève brute) engorgeant les vaisseaux de sorte que les racines ne puissent plus tirer l'eau. Dans le cas des céréales qui sont exposés à de longues périodes de froid, la survie de la plante dépendrait de la capacité des racines à éliminer ce phénomène. Aloni et Griffith (1991), ont trouvé que la formation d'une zone de sécurité au niveau de la jonction tige-racine peut protéger les racines contre l'embolisme. Ces auteurs en analysant la forme anatomique de cette zone chez plusieurs céréales ont remarqué une corrélation entre la forme de la jonction et la capacité des espèces à tolérer le gel. Ainsi, le blé, le seigle et l'orge possèdent un système vasculaire qu'ils ont décrit étant « sécuritaire », car les vaisseaux de la racine sont séparés de ceux de la tige par des trachéides (cellules allongées séparées et non perforées), tandis que d'autres céréales comme le maïs et le sorgho, possèdent un système vasculaire « moins sécuritaire » où les vaisseaux racinaires sont en continuité avec ceux de la tige. Cette propriété pourrait constituer chez le blé un mécanisme physiologique complémentaire aux mécanismes de régulation, et ça pourrait faire en sorte qu'une expression moindre de *CBF* serait requise dans les racines. Par ailleurs, Tanino et McKersie (1985), Livingston *et al.* (2006), Skinner et Garland-Campbell (2008) considèrent que le collet qui abrite le méristème apical joue un rôle important dans la reprise de croissance de la plante après le dégel. D'ailleurs très souvent le collet a été utilisé comme le matériel végétal de choix pour étudier la régulation au froid, considérant que le maximum de gènes devraient être exprimé à ce niveau (Stockinger *et al.*, 2007, Sutton *et al.*, 2009). Dans notre cas, la faible expression des *CBF* dans le collet pourrait indiquer qu'il existe des molécules protectrices produites dans les feuilles puis transportées au collet. Par ailleurs, les connaissances actuelles

concernant les mécanismes impliqués dans le phénomène d'acclimatation au froid restent encore limitées malgré les progrès réalisés ces dix dernières années (Thomashow, 2010). Fowler et Thomashow (2002) ont trouvé que chez *Arabidopsis* 28% des gènes en réponse au froid n'étaient pas régulés par les facteurs de transcription *CBF*. Ceci a été associé à l'existence de plusieurs voies de régulation en réponse aux basses températures. Par exemple, *ZAT12* est un facteur de transcription indépendant de la voie des *CBF*, et participerait à l'induction et à la répression des gènes de réponse au froid (Vogel *et al.*, 2005). D'autres mécanismes pourraient contribuer à atténuer les dommages du froid dans le collet. En effet, le méristème apical se trouve toujours enveloppé dans un ensemble d'ébauches foliaires qui pourraient constituer une barrière physique contre le froid et le vent. Les tiges et les feuilles restent les organes les plus exposés au froid, au vent et aux agressions externes. La plante pour éviter l'altération de ces organes doit développer plusieurs mécanismes de régulation dans ces régions. Effectivement, Winfield *et al.* (2010) en analysant le transcriptome chez le blé exposé aux basses températures ont trouvé que la majorité des changements dans l'abondance des transcrits étaient survenues dans les feuilles. Selon nos résultats, tous les *CBF* analysés étaient plus ou moins fortement exprimés dans ces organes et certains étaient exprimés différemment entre l'épiderme et le mésophylle. Très peu d'études de localisation ont été menées sur les facteurs de transcription *CBF*. Chez le blé, Che (2008) a rapporté que l'expression au froid de *CBFIVd-B4* est associée préférentiellement aux tissus vasculaires du collet et des jeunes feuilles ainsi qu'au mésophylle et les cellules de garde des feuilles matures. Che (2008) a avancé l'hypothèse que le gène *CBFIVd-B4* interviendrait dans le fonctionnement et le maintien de la tolérance du collet et d'autre part à empêcher l'accumulation de la glace dans les zones sous stomatiques. Effectivement, le collet reste essentiel pour la régénération de la plante après le dégel, de même que les tissus du mésophylle et les cellules de garde sont adjacents aux chambres sous stomatiques, lieux de formation des cristaux de glace lors du gel. Le mésophylle, qui se trouve entre les deux couches de l'épiderme (supérieur et inférieur), est constitué de deux types de parenchyme dont le parenchyme palissadique. Celui-ci est riche en chloroplastes et joue un rôle important dans la photosynthèse. L'épiderme lui, est composé d'une seule couche de cellules, en général transparente et dépourvue de chloroplastes. Kobayashi *et al.* (2004) ont rapporté que certains gènes *COR* chez le blé dont *Wcor 14*, *Wcor 15* et *Rep 14* codent pour des protéines



chloroplastiques. Ils seraient dans ce cas spécifiquement associés aux tissus chlorophylliens dont le mésophylle. *Wcor 14* possède un élément CRT/DRE au niveau de son promoteur et est activé par les facteurs de transcription *CBF* (Kobayashi *et al.*, 2005). Dans notre cas, *CBFIIIId-12.1* qui lui est exprimé dans le mésophylle pourrait être un régulateur à ce type de gènes *COR*. L'analyse du transcriptome au niveau de tissus spécifiques est possible grâce à la technique de microdissection au laser. En effet, Matas *et al.* (2010) ont réussi par cette technique à isoler les cellules épidermiques des cellules sous-épidermiques du fruit vert de *Citrus clementina*. Les transcrits ont été analysés par RT-PCR et micropuces à ADNc et des différences dans les profils d'expression des gènes entre les deux types de tissus ont pu être observées. Selon ces auteurs, ces différences révèlent l'existence de voies métaboliques spécifiques aux tissus qui peuvent être liées à leur composition respective en organites et à la spécialisation des parois cellulaires. Ainsi, ils ont trouvé que les gènes sub-épidermiques prédominants étaient principalement impliqués dans la photosynthèse ainsi que dans la biosynthèse et la restructuration des parois cellulaires. En revanche, les gènes dominants dans l'épiderme étaient liés à la biosynthèse de la cuticule et flavonoïdes et aux réponses de défenses contre les agents pathogènes. En conclusion, la présence de profils d'expression spécifiques aux *CBF* suggère que chacun des *CBF* aurait un rôle bien particulier dans les mécanismes de réponse au froid. Ces différences sont observées entre les groupes *CBF* mais aussi au sein d'un même groupe tel que dans *CBFIVd* et *CBFIIIId*. Ces résultats suggèrent la possibilité à encore subdiviser ces deux groupes en d'autres sous groupes fonctionnels. Cette idée est renforcée par les résultats de Mohseni (2011) ayant analysé la structure secondaire des *CBF* du blé, et qui a suggéré que les groupes *CBFI*, *CBFII*, *CBFIIIId* et *CBFIVd* pourraient être subdivisés en deux sous-groupes chacun et *CBFIIIc* et *CBFIVa* en trois sous-groupes chacun. Les recherches futures devront focaliser sur l'étude de l'expression de gènes additionnels impliqués dans l'acclimatation, afin de mieux comprendre les interactions/complémentarités entre ces gènes. Par ailleurs, des études additionnelles doivent être menées afin d'élucider le rôle des *CBF* dans l'activation transcriptionnelle des gènes *COR* et de comprendre les façons dont les *CBF* sont eux mêmes régulés. Enfin, la compréhension des mécanismes de tolérance au froid du blé conduit à la mise en évidence de gènes candidats qui pourront être utilisés comme des marqueurs moléculaires pour la sélection dans les programmes d'amélioration du blé.

## APPENDICE A

Aussi, j'ai travaillé dans le cadre d'un projet dont l'objectif comportait deux volets. Le premier volet consistait à répertorier les gènes *CBF* impliqués dans la tolérance au froid chez le blé Norstar. Le deuxième volet consistait à examiner la région codante des gènes *CBF* chez deux cultivars de printemps Manitou et Chinese spring afin de détecter les polymorphismes pouvant affecter la séquence ou la structure des protéines (Mohseni *et al.*, 2012).

J'ai été impliqué dans le deuxième volet du projet et ma contribution consistait à atteindre l'étape du séquençage des gènes *CBF* chez le cultivar Manitou. Pour ce faire, des amorces spécifiques ont été utilisés afin d'amplifier les gènes *CBF* à partir de l'ADN Manitou (Tableau A1). L'amplification a été effectuée en utilisant 0.3 uM de chaque amorce spécifique, 10–20 ng d'ADN génomique, 1X de solution enhancer, et l'ADN polymérase Pfx (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Les PCR ont été initiés avec une incubation de 120 s à 94 °C suivi de 45 cycles de 94 °C pour 20 s, 60 °C pour 20 s, et 68 °C pour 60 s.

Les produits PCR ont été analysés sur gels (figures annexes A.2 à A.5) et les produits PCR sélectionnés ont été clonés dans des vecteurs Zero Blunt TOPO puis extraits par miniprep (voir matériel et méthodes). Avant d'envoyer les résultats au séquençage, des digestions enzymatiques EcoRI ont été réalisés pour vérifier la présence des gènes d'intérêt (Figures A.6- A.13).

L'amplification par PCR à partir de l'ADN génomique des cultivars Manitou et Chinese Spring ainsi que l'amplification par PCR à partir des bibliothèques d'ADNc et l'analyse des séquences génomiques de blé publiés sur NCBI, ont permis dans un premier temps

d'identifier 28 gènes *CBF* additionnels chez le blé hexaploïde. Pour comprendre la relation entre les *CBF* nouvellement identifiés et ceux déjà existant, une compilation des gènes *CBF* à partir de la plateforme non redondante de NCBI a été réalisée. L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques a montré que le blé contiendrait 27 groupes de gènes avec 1 à 3 homéologues provenant des 3 génomes du blé hexaploïde. Cette conclusion assume que le blé hexaploïde possèdera un orthologue du gène *TmCBFIIIb-18* démontrant 91.3% d'identité avec son homologue le plus proche *TaCBFIIIb-23.1*, et que les 5 gènes identifiés du groupe II représentent au moins deux paralogues *CBF*. L'analyse bioinformatique des protéines *CBF* a montré que parmi les 64 gènes identifiés chez Norstar tolérant au gel, il existe 1) deux pseudogènes *CBF* (*IIIc-13.1a* et *IVd-B22a*) codants des protéines qui sont exprimés mais non fonctionnelle à cause de la présence d'insertion/délétion dans la séquence et de codon stop interne; 2) 5 *CBF* (*II-5.5*, *IIIc-3.1*, *IVa-2.2*, *IVb-A20* et *IVb-21.2*) dont les protéines démontrent des extensions/délétions d'acides aminés dans leur domaine C-terminal; 3) 19 gènes additionnels qui codent pour des protéines ayant des séquences et des structures qui s'écartent du consensus au sein du domaine conservé des *CBF*. Concernant le répertoire des gènes *CBF* chez les cultivars de printemps Chinese Spring et Manitou, l'analyse a révélé qu'ils ont des polymorphismes additionnels touchant les positions conservées au sein de ces domaines. Par exemple, 10 allèles *CBF* ont été spécifiquement retrouvés chez les cultivars de printemps (*TaCBFII-5.1b*, *TaCBFIIIc-3.2b*, *TaCBFIIIc-13.1c*, *TaCBFIIId-15.2b*, *TaCBFIIId-16.1b*, *TaCBFIIId-A19b*, *TaCBFIIId-24.2b*, *TaCBFIVb-A20b*, *TaCBFIVd-9.1b* et *TaCBFIVd-26.2b*). De plus, cette analyse a permis d'identifier 110 polymorphismes avec changements d'une base (SNP). Ces changements incluent 75 transitions ( $A \leftrightarrow G$ ,  $T \leftrightarrow C$ ) et 35 transversions ( $A/G \leftrightarrow C/T$ ). Parmi les 110 polymorphismes, 43 représentent des changements silencieux, ne causant aucun changement sur les protéines, 66 représentent des mutations faux-sens causant des substitutions d'acides aminés, et une représente une mutation non-sens qui change un codon d'acide aminé par un codon stop. Enfin, les analyses de la distribution des noyaux hydrophobiques retrouvés chez des protéines des deux cultivars de printemps, Chinese Spring et Manitou, ont montré que le gène *TaCBDIIIc-13.1c* est différent et contient une insertion de 11 acides aminés dans le domaine AP2, mais aussi une délétion d'une base qui change le cadre de lecture. Par ailleurs, l'analyse a révélée que trois protéines *TaCBFIIIc-3.2a*, *TaCBFIIId-A19a* et *TaCBFIIId-15.2a*, présentent des changements qui l'approchent du



consensus et d'autres qui l'éloignent. La protéine TaCBFIVb-A20b, possède des changements qui l'éloignent du consensus. Comprendre l'effet de ces polymorphismes et de d'autres répertoriés dans l'étude de Mohseni et al., (2012) permettra de rajouter de l'information pour la sélection d'allèles CBF optimaux dans les programmes de croisement de céréales.

**Tableau A.1 Les amorces spécifiques utilisées dans l'amplification des gènes *TaCBF* à partir de l'ADN génomique de différents cultivars de blé.**

Nom du gène	Code	Nom de la sonde	Direction	Séquence
<i>TaCBFI-1.1</i>	Ma02	1.1_F1	Sens	5'-TTCCACTCCCTCCCCAGCTTACA-3'
		1.1_R1	Anti-sens	5'-GGAGTTCGAACACTCACAAGCCATAACC-3'
<i>TaCBFI-1.2</i>	Ma03	1.2_F1	Sens	5'-TTCCACTCCCACCCCAGCTTACA-3'
		1.2_R1	Anti-sens	5'-CGGAGTTCGAACACTCACAATCCATAACC-3'
<i>TaCBFI-1.3</i>	Ma04	1.3_F1	Sens	5'-CTTCCACTTCCTCCCCAGCTTACAC-3'
		1.3_R1	Anti-sens	5'-CCTTCGGAGTTAAACACTAACAAGCCATAACC-3'
<i>TaCBFII-5.1</i>	Ma05	5.1_F1	Sens	5'-AAGGCTCACCCACACAAACAACCAC-3'
		5.1_R1	Anti-sens	5'-GAGCAAGCCAATCGGGCTAGAGAC-3'
<i>TaCBFII-5.2</i>	Ma06	5.2_F1	Sens	5'-CAACATCACCTCACTCACCAGTCACCA-3'
		5.2_R1	Anti-sens	5'-GGAGCAAGCCAATCGAGATGAAGAATG-3'
<i>TaCBFII-5.3</i>	Ma07	5.3_F1	Sens	5'-TCACCTCACCTCACTCACCACCATTG-3'
		5.3_R1	Anti-sens	5'-GAAAGCTGACCGGGCTGGAGAATG-3'
<i>TaCBFII-5.4</i>	Ma08	5.4_F1	Sens	5'-CCAACACCATTGATTCGCTAGCTACAGT-3'
		5.4_R1	Anti-sens	5'-CGCTCAGCAAACTGGCTGCATATATTTC-3'
<i>TaCBFII-5.5</i>	Ma09	5.5_F1	Sens	5'-CAACACCATTGCTACTTGCTACGGACA-3'
		5.5_R1	Anti-sens	5'-AACTGGGTTGCGCATCTTCTCTGAC-3'

<i>TaCBFIIIa-6.1</i>	Ma10	6.1_F1	Sens	5'-GCCAAGGAACAGAGCATCGAAGGAA-3'
		6.1_R1	Anti-sens	5'-GTAAAAATATTCGAACTGGCGCGAACTAGC-3'
<i>TaCBFIIIa-6.2</i>	Ma11	6.2_F1	Sens	5'-CCAAAAGCATCCTCAGCAACAAGAACC-3'
		6.2_R1	Anti-sens	5'-AGCTAAAACTCGAAGCAGCGCGAACTA-3'
<i>TaCBFIIIa-D6</i>	Ma12	D6_F1	Sens	5'-AAAACCACTTCACACTCGAGCAACACC-3'
		D6_R1	Anti-sens	5'-GGTAAAAATATTCTAACTGGCGCGAACTATTGC-3'
<i>TaCBFIIIb-23.1</i> ,14	Ma13	23.1_F1	Sens	5'-TCTCACTCCAGCGCAATCATCAAGC-3'
		23.1_R1	Anti-sens	5'-TGAGAGGAATGAGGAGACACGCAGAAC-3'
<i>TaCBFIIIb-23.2</i> ,16	Ma15	23.1_F1	Sens	5'-TCTCACTCCAGCGCAATCATCAAGC-3'
		23.2_F1	Sens	5'-ACTAGCTATCGACCAGCAGCCAGCAG-3'
		23.1_R2	Anti-sens	5'-GGACTGTCTCGGGACGTGGATCATAA-3'
<i>TaCBFIIIb-23.3</i> ,14	Ma13	23.1_F1	Sens	5'-TCTCACTCCAGCGCAATCATCAAGC-3'
		23.1_R1	Anti-sens	5'-TGAGAGGAATGAGGAGACACGCAGAAC-3'
<i>TaCBFIIIc-3.1</i> ,18	Ma17	3.2_F1	Sens	5'-GCTCAACAAGCTAGCTCACACTCCTCAGT-3'
		3.1_R1	Anti-sens	5'-ATCAGCTGCCAACTGGGAATTATCGAC-3'
<i>TaCBFIIIc-3.2</i>	Ma19	3.2_F1	Sens	5'-GCTCAACAAGCTAGCTCACACTCCTCAGT-3'
		3.2_R1	Anti-sens	5'-TTTTTGCGAGGGGAATTATCGACTGTACTA-3'
<i>TaCBFIIIc-D3</i>	Ma20	D3_F1	Sens	5'-ACAATTAGCTCACGGCCTCACACTCCT-3'
		D3_R1	Anti-sens	5'-TTTTGCGGGGGGATTATCGACACTA-3'
<i>TaCBFIIIc-B10</i>	Ma21	B10_F1	Sens	5'-CAAGGAAGCCACCTGCCAATCAC-3'
		B10_R1	Anti-sens	5'-CGCTACAGAGTCAAAACAAAAGCAGAATCG-3'

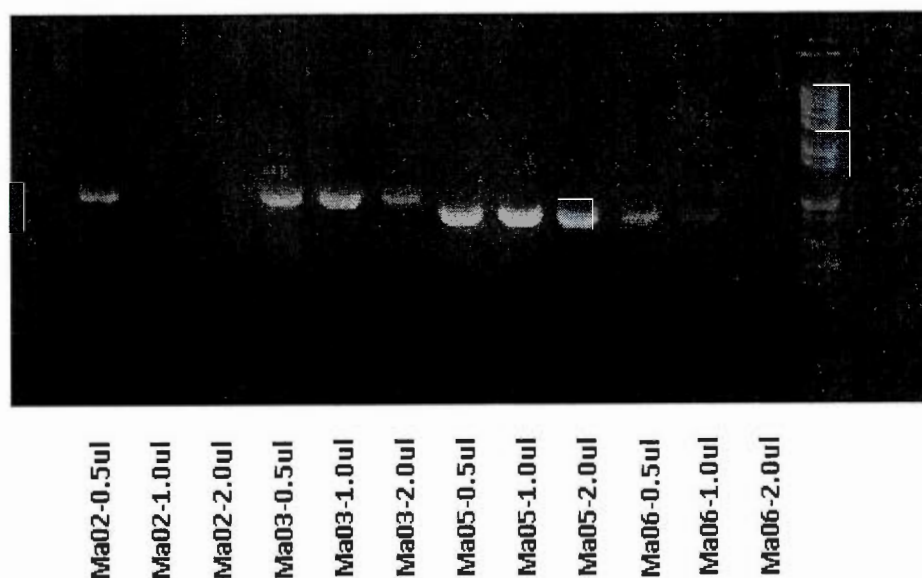
<i>TaCBFIIIc-10.1</i>	Ma22	10.1_F1	Sens	5'-ACCAAGCTCGACTGCTCAGAAAGGAAG-3'
		10.1_R1	Anti-sens	5'-CGTCTCAGCTAGAGAAGAACCGGAGTATAAACAG-3'
<i>TaCBFIIIc-10.2</i>	Ma23	10.2_F1	Sens	5'-GCACCAAGCTCGACTGCTCCATAAG-3'
		10.2_R1	Anti-sens	5'-CGAAATTGGAAAACCTTTGCGAAGGAAA-3'
<i>TaCBFIIIc-13.1</i>	Ma24	13.1_F1	Sens	5'-GATCACCCGACGCTCTCAATCAAG-3'
		13.1_R1	Anti-sens	5'-AGAATCAGATGGGGAATCATTTATCGACAC-3'
<i>TaCBFIIId-12.1</i>	Ma25	12.1_F1	Sens	5'-TACTCCAGCCAGCCAACTAGCCTAGCA-3'
		12.1_R1	Anti-sens	5'-CCTATCACTGGCCTTTTATTATGCCCATC-3'
<i>TaCBFIIId-B12</i>	Ma26	B12_F1	Sens	5'-GCTCCTCCTCCAGTCAACTAGTCAAGCA-3'
		B12_R1	Anti-sens	5'-TCCCGCGATTTTATTATGCCGATGAT-3'
<i>TaCBFIIId-A15</i>	Ma27	A15_F1	Sens	5'-CCATAGATCGACCTTGGCTACCGTA-3'
		A15_R1	Anti-sens	5'-CAGGATTTGATGGGTTCAGTTCCACA-3'
<i>TaCBFIIId-15.2</i>	Ma28	15.2_F1	Sens	5'-CGACCACCTGCAGTACCAATGGA-3'
		15.2_R1	Anti-sens	5'-TCAAAGCAGCTGGCTGGAGTGTTTTAGTAG-3'
<i>TaCBFIIId-16.1</i>	Ma29	16.1_F1	Sens	5'-CAACCTGATCTCACACTCCACAGACCA-3'
		16.1_R1	Anti-sens	5'-CGATAGAGTCAAAGCAGCTGGTTCAGCA-3'
<i>TaCBFIIId-16.2</i>	Ma30	16.2_F1	Sens	5'-CCTGCTCTCACACTCCACAGAACACC-3'
		16.2_R1	Anti-sens	5'-TGGAATCAACTGCCATAGAGTGTCAAAGC-3'
<i>TaCBFIIId-A19</i>	Ma34	A19_F1	Sens	5'-GCTCAAGCTCAACTACAGTGACCAATTCC-3'
		A19_R1	Anti-sens	5'-TGAACCCACTGGAGGTTACAGACATCAG-3'
<i>TaCBFIIId-B19</i>	Ma35	B19_F1	Sens	5'-CAAGCTCAGCTAGACCGACCACATTCC-3'

		B19_R1	Anti-sens	5'-CAGTGTGAACCCACTGAAGGTTACTGACATC-3'
<i>TaCBFIIIa-D19</i>	Ma36	D19_F1	Sens	5'-GCGATCGGCACTCCGACAGCTA-3'
		D19_R1	Anti-sens	5'-GTGTGAACCCACTGCAGGTTACAGACA-3'
<i>TaCBFIIIa-24.2</i>	Ma38	24.2_F1	Sens	5'-CTCCACACGTACCCAAGTGGCAATC-3'
		24.1_R1	Anti-sens	5'-CAGTGTGAACCCGTTGGAGGTTATCG-3'
<i>TaCBFIVa-A2</i>	Ma39	A2_F1	Sens	5'-TCGTTACACCACAAACCACTCTCAACG-3'
		A2_R1	Anti-sens	5'-GCACTAGCAGTACTCTCTAGATCTTTACATTGCTTA-3'
<i>TaCBFIVa-2.2</i>	Ma40	2.2_F1	Sens	5'-CCTCGTTACACCACAACTGCTCTCAAC-3'
		2.2_R1	Anti-sens	5'-AGCACTAGCAGTACTCTCTAGAACTTTACATTGCTT-3'
<i>TaCBFIVa-25.1</i>	Ma42	25.1_F1	Sens	5'-CTCACTAGCTCCGAAGTCCGAACACAC-3'
		25.1_R1	Anti-sens	5'-AACACAGTACTGCTCTCTACAACCTTTACACATCC-3'
<i>TaCBFIVa-25.2</i>	Ma43	25.2_F1	Sens	5'-CTCCGGCTCACTAGCTCTGAACACAC-3'
		25.2_R1	Anti-sens	5'-CAGTGCTGCTCGCCCTCTACAACCTTTAC-3'
<i>TaCBFIVb-A20</i>	Ma44	A20_F1	Sens	5'-ATCCCAACTCCACCGCTCAAACC-3'
		A20_R1	Anti-sens	5'-TCTTCCCATATTTGGACGAACACAACC-3'
<i>TaCBFIVb-B20</i>	Ma45	B20_F1	Sens	5'-ACTCAAACCAACCTGCAACTCTCAAC-3'
		B20_R1	Anti-sens	5'-GTTTCTAAAACGTACATGCCTTAATTAGTCGGATA-3'
<i>TaCBFIVb-D20</i>	Ma46	D20_F1	Sens	5'-ATCCCAACTCGACCGCTCAAACC-3'
		D20_R1	Anti-sens	5'-GAGGGAGTAGTTTCCAAAACGTACATGGCTTA-3'

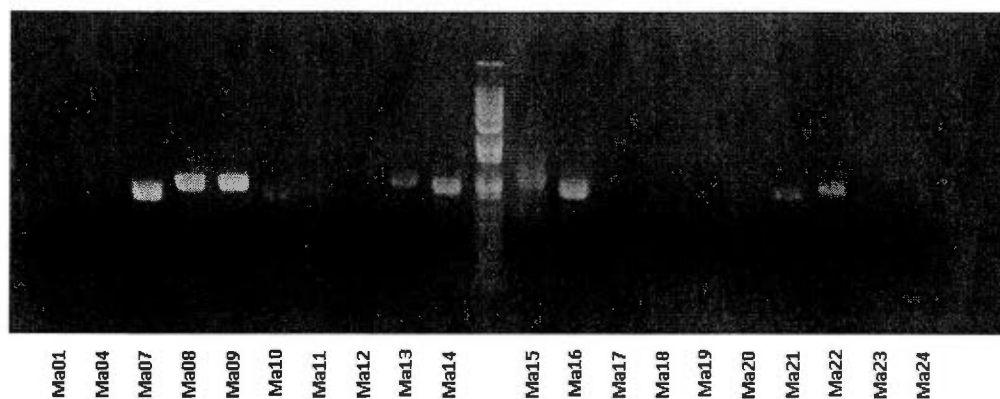
<i>TaCBFIVb-21.1</i>	Ma47	21.1_F1	Sens	5'-CAATCCATCGACCCTCACCACAAC-3'
		21.1_R1	Anti-sens	5'-GTGGGACAGAAGTGCAGAGCCAACT-3'
<i>TaCBFIVb-21.2</i>	Ma49	21.2_F1	Sens	5'-CACTCCATCGACCCTCAGCACAAC-3'
		21.2_R1	Anti-sens	5'-TTTGGTGGGACAGAAGTACAGAACCAACT-3'
<i>TaCBFIVb-D21</i>	Ma48	D21_F1	Sens	5'-GGAGCCCCAATCAATCGAACCTC-3'
		D21_R1	Anti-sens	5'-CCATATCTGGTGGGACAGAAGTATAGAACCAAC-3'
<i>TaCBFIVc-14.1</i>	Ma50	14.1_F1	Sens	5'-GCAGCAGCTAAACTCCCTGCTTAATTACC-3'
		14.1_R1	Anti-sens	5'-TGGAACAGAAGCAGAGAAACCGTCTAAAAAC-3'
<i>TaCBFIVc-B14</i>	Ma51	B14_F1	Sens	5'-CTCAACGCAGCAGCTAAACACGCTAAG-3'
		B14_R1	Anti-sens	5'- GGTGGAACAGAAGAGAGAAACTATCTATACAAACAT-3'
<i>TaCBFIVc-14.3</i>	Ma52	14.3_F1	Sens	5'-CTCACCGCCCCTCTCTCCAGCAT-3'
		14.3_R1	Anti-sens	5'-GGTGGAACAGAAGAGAGAAACCATCTACAAAC-3'
<i>TaCBFIVd-4.1</i>	Ma53	4.1_F1	Sens	5'-ACACCATCGCTCAACGTGCTCAAC-3'
		4.1_R1	Anti-sens	5'-TGGGAAGAACACAACGCAACTATCGAC-3'
<i>TaCBFIVd-B4</i>	Ma54	B4_F1	Sens	5'-AACACCATCGCTCAACCTGCTCAAC-3'
		B4_R1	Anti-sens	5'-CCAGATCGGGAAGAACACAACAGAAC-3'
<i>TaCBFIVd-26.2</i>	Ma56	26.2_F1	Sens	5'-CAAACCTCTCTACACAGCTGCTGATTCTTCC-3'
		26.2_R1	Anti-sens	5'-TGCTATACACAACGAAGAAACAACTGCCTACTCT- 3'
<i>TaCBFIVd-9.1</i>	Ma57	9.1_F1	Sens	5'-CAACACAGCCGTTGATTCTTCCACTACT-3'
		9.1_R1	Anti-sens	5'-AGGCGACTATCTACAACCTTGACAGTATCGCTAA-3'



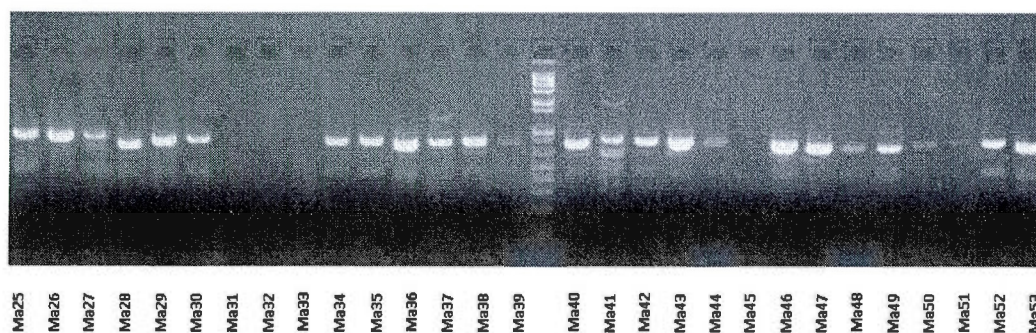
<i>TaCBFIVd-B9</i>	Ma58	B9_F1	Sens	5'-GCCGCTGATTCCATCACTACTACCACTC-3'
		B9_R1	Anti-sens	5'-AAGAGCGCGACTATCTACAACCTGGCAGTA-3'
<i>TaCBFIVd-D9</i>	Ma59	D9_F1	Sens	5'-CCGCTGATTCTTCCAGTACTCCTGCT-3'
		D9_R1	Anti-sens	5'-CTGCCTAGTATGTTTCTTCCTAAATCTACAACCTGA-3'
<i>TaCBFIVd-A22</i>	Ma60	A22_F1	Sens	5'-CCAGTTCTCAGCGGAAACACAGCAAC-3'
		A22_R1	Anti-sens	5'-AACAAGATGCTATCTATGGTACAGCTTTACACTGC-3'
<i>TaCBFIVd-B22</i>	Ma61	B22_F1	Sens	5'-CCTCCAGTTCTCAGCACACATCGAC-3'
		B22_R1	Anti-sens	5'-CGGACAGAGGGAGTACAACCTTTACACTGCTAGAT-3'



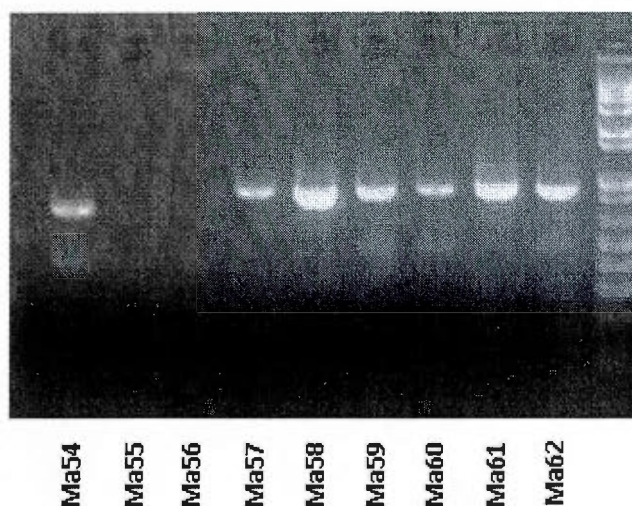
**Figure A.1 Optimisation des conditions PCR en évaluant plusieurs dilutions d'ADN génomique de Manitou pour 4 gènes *CBF*.** Les amorces (Ma02-Ma06) pour les gènes *CBF* sont décrites dans le Tableau A1. L'amplification a été effectuée en utilisant les amorces spécifiques (0.3  $\mu$ M chaque), 10–20 ng d'ADN génomique, 1X de solution enhancer, et l'ADN polymérase Pfx (Invitrogen) selon les recommandations du manufacturier. Le PCR est initié avec une incubation de 120 s à 94 °C suivi de 45 cycles de 94 °C pour 20 s, 60 °C pour 20 s, et 68 °C pour 60 s.



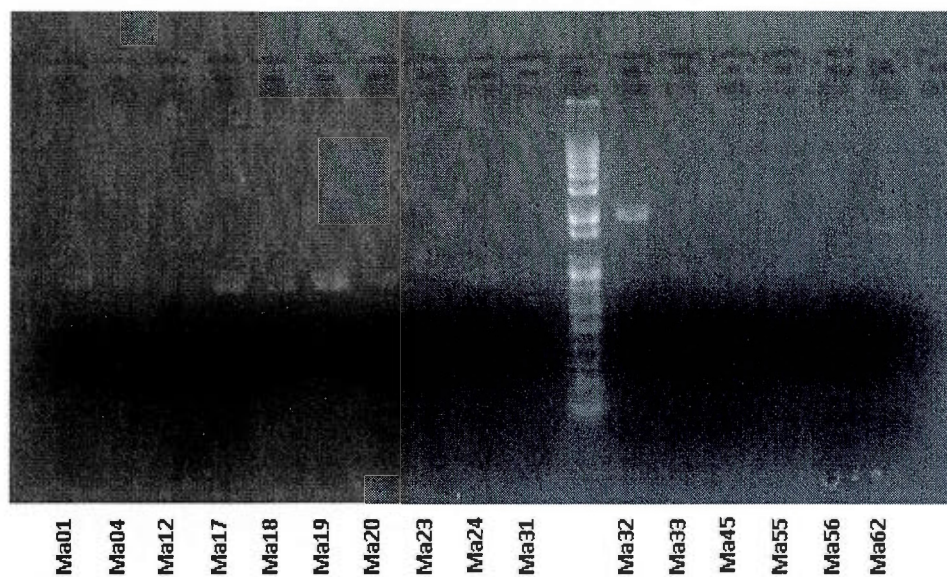
**Figure A.2** Amplification PCR des gènes *CBF* de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma01-Ma24. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1.



**Figure A.3** Amplification PCR des gènes *CBF* de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma25-Ma53. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1.

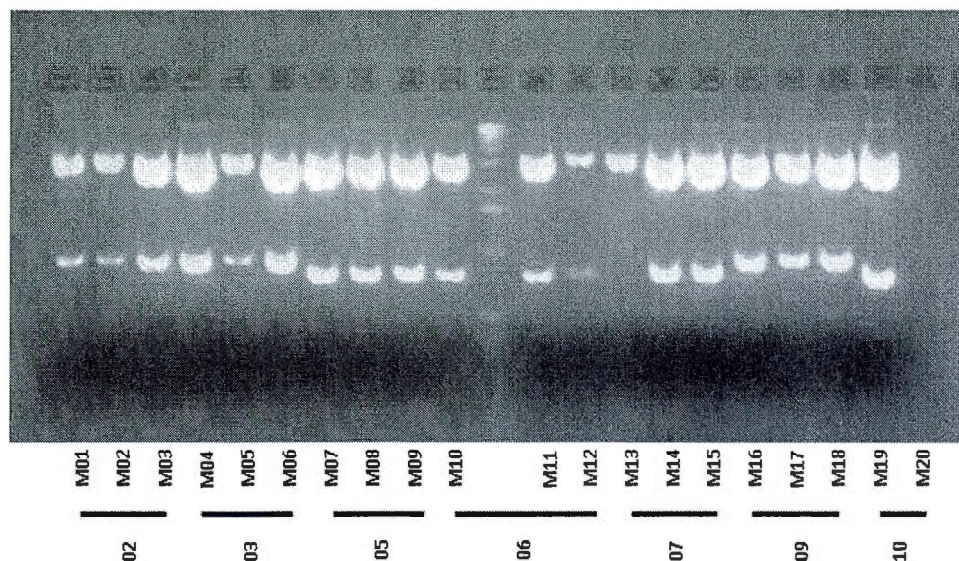


**Figure A.4** Amplification PCR des gènes *CBF* de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma54-Ma62. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1.



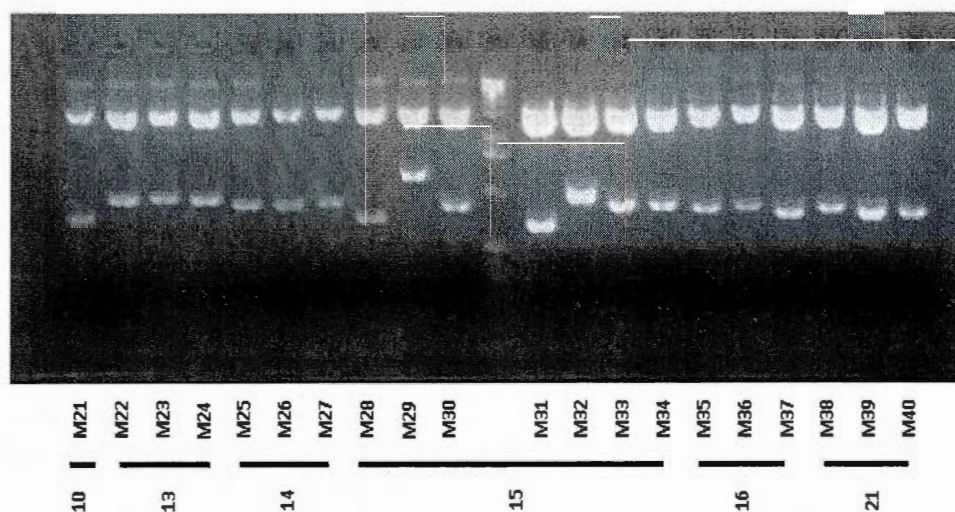
**Figure A.5** Amplification PCR des gènes *CBF* de Manitou en utilisant les amorces spécifiques Ma01-Ma62. Toutes les autres conditions sont décrites dans la légende de la figure A.1 excepté qu'ici la température d'appariement était de 58°C pour 20 s.



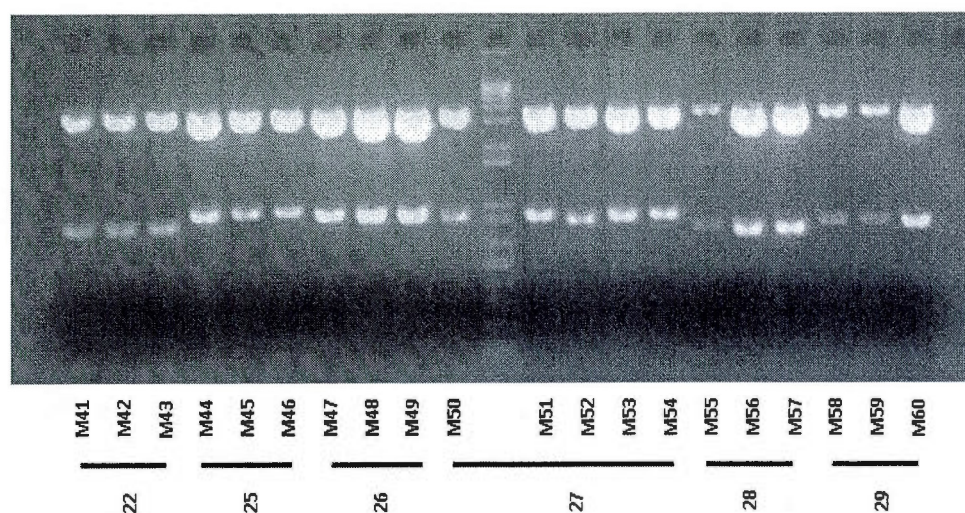


**Figure A.6 Digestion EcoRI de plasmides (M01-M20).** Les produits d'amplification (Figs. A.1 à A.5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 02 à 10) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 2 à 3 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M01-M20). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.

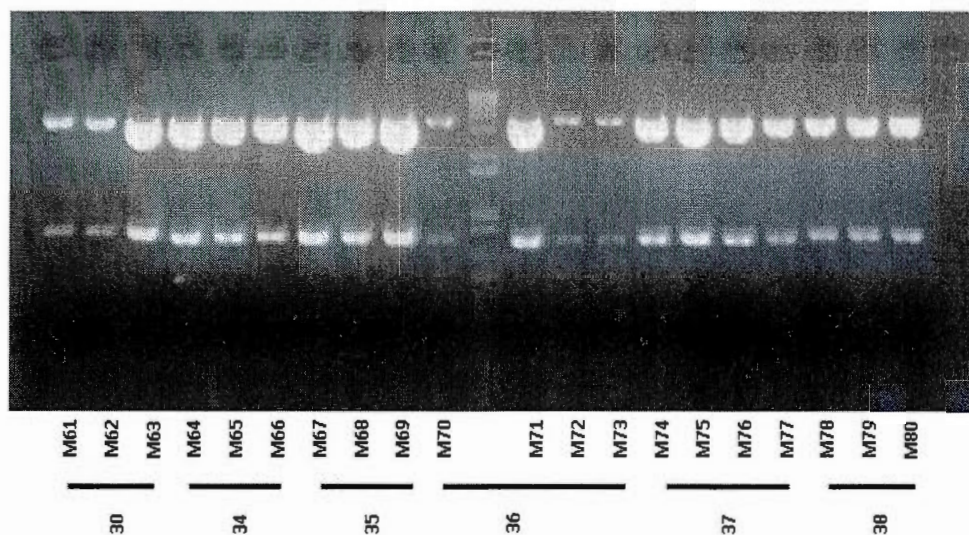




**Figure A.7 Digestion EcoRI de plasmides (M21-M40).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 10 à 21) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 7 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M21-M40). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.

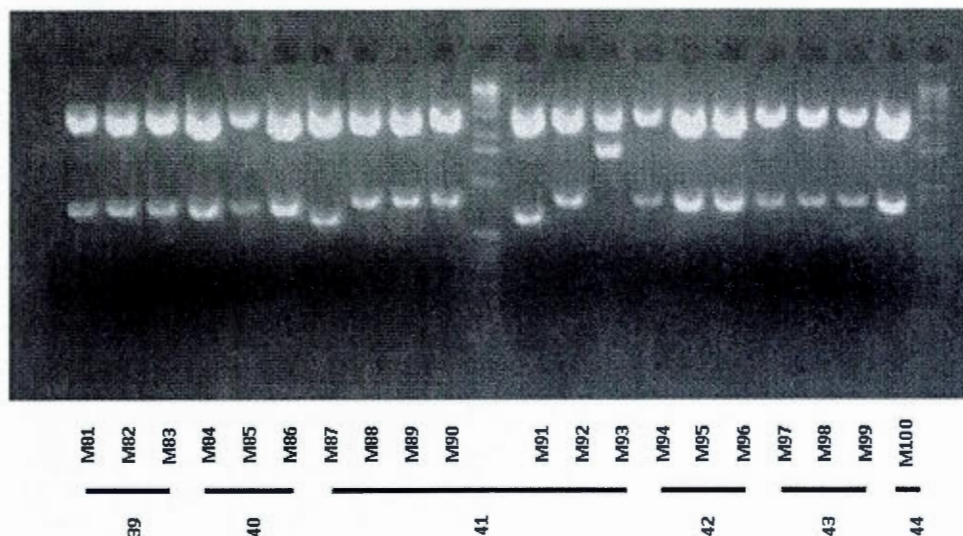


**Figure A.8 Digestion EcoRI de plasmides (M41-M60).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 22 à 29) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 3 à 5 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M41-M60). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.

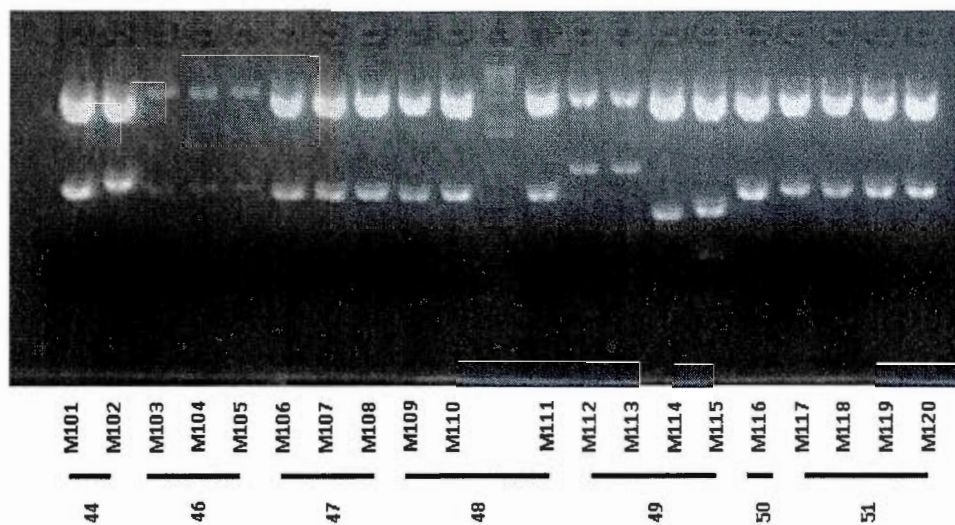


**Figure A.9 Digestion EcoRI de plasmides (M61-M80).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 30 à 38) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 3 à 4 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M61-M80). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.

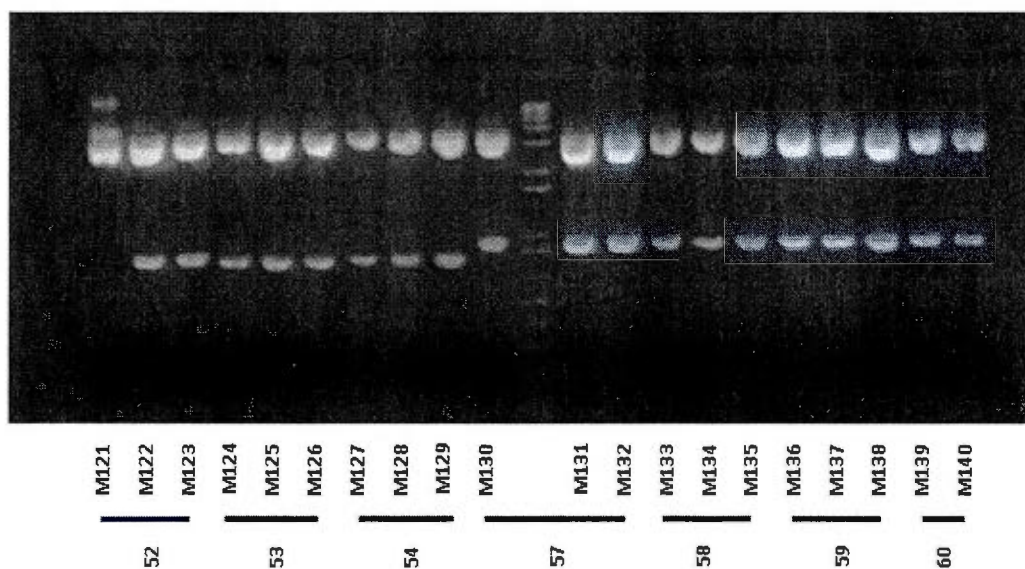




**Figure A.10 Digestion EcoRI de plasmide (M81-M100).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 39 à 44) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 7 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M81-M100). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.

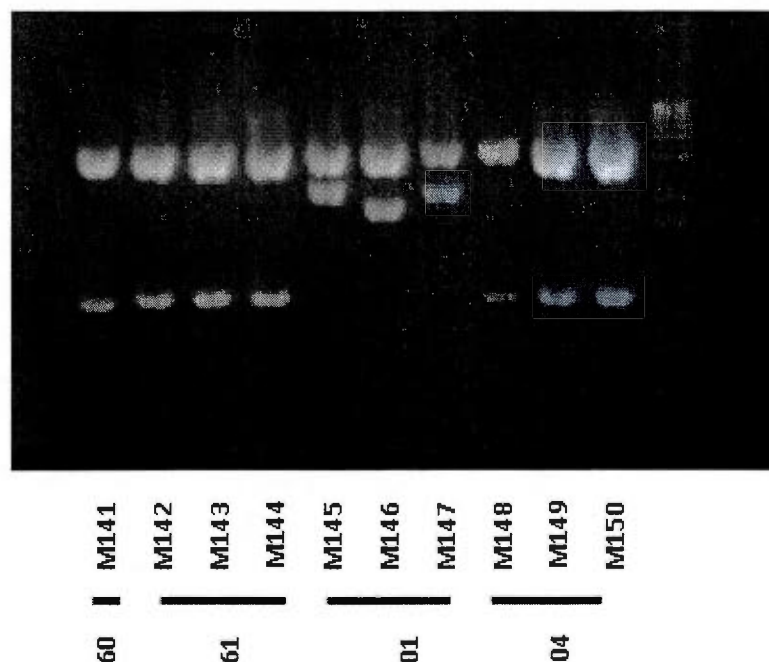


**Figure A.11 Digestion EcoRI de plasmide (M101-M120).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 44 à 51) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 4 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M101-M120). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.



**Figure A.12 Digestion EcoRI de plasmide (M121-M140).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 52 à 60) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 2 à 3 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M121-M140). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.





**Figure A.13 Digestion EcoRI de plasmide (M141-M150).** Les produits d'amplification (Figs. A1 à A5) avec des tailles attendues (identifiés ici par juste leur numéro 60 à 04) ont été ligués au vecteur ZERO Blunt TOPO (Invitrogen), transformés dans des bactéries compétentes, sélectionnés sur un milieu (agar-LB-kanamycine), et 1 à 3 clones (pour chaque produit d'amplification) ont été choisis pour une minipréparation de plasmide et digestion EcoRI (M141-M150). Les plasmides avec des inserts de la bonne taille ont été séquencés.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aberlenc-Bertossi, F., Sané, D., Daher, A., Borgel, A., Duval, Y., 2006.** Aptitude à la déshydratation des embryons zygotiques de palmier à huile et de palmier dattier : étude de l'expression de gènes *LEA*. *Les Actes du BRG* 6, pp. 401-413
- Achard, P., Renou, J.-P., Berthomé, R., Harberd, N.P., Genschik, P., 2008.** Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the level of reactive oxygen species. *Current Biology* 18, pp. 656-660
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.-H., Fujii, H., Zheng, X., Zhu, J.-K., 2006.** A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry* 281, pp. 37636-37645
- Aloni, R., Griffith, M., 1991.** Functional xylem anatomy in root-shoot junctions of six cereal species. *Planta* 184, pp. 123-129
- Atici, O., Nalbantoglu, B., 1998.** Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry* 50, pp. 755-761
- Badawi, M., Danyluk, J., Boucho, B., Houde, M., Sarhan, F., 2007.** The *CBF* gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal *CBFs*. *Molecular Genetics and Genomics* 277, pp. 533-554
- Badawi, M., Reddy, V.Y., Agharbaoui, Z., Tominaga, Y., Danyluk, J., Sarhan, F., Houde, M., 2008.** Structure and Functional analysis of wheat ICE (inducer of *CBF* expression) genes. *Plant Cell Physiol* 49, pp. 1237-1249

- Băga, M., Chodaparambil, S.V., Limin, A.E., Pecar, M., Fowler, D.B., Chibbar, R.N., 2007.** Identification of quantitative trait loci and associated candidate genes for low-temperature tolerance in cold-hardy winter wheat. *Functional and Integrative Genomics* 7, pp. 53-68
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., Thomashow, M.F., 1994.** The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* 24, pp. 701-713
- Bravo, L.A., Close, T.J., Corcuera, L.J., Charles L.G., 1999.** Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 106, pp. 177-183
- Chauvin, L.P., Houde, M., Sarhan, F., 1993.** A leaf-specific gene stimulated by light during wheat acclimation to low temperature. *Plant Molecular Biology* 23, pp. 255-265
- Che, H., 2008.** La spécificité d'expression cellulaire de gènes *CBF* du blé. Mémoire de maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal, Canada, 71p
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-H., Hong, X., Agarwal, M., Zhu, J.-K., 2003.** ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 17, pp. 1043-1054
- Choi, H.-I., Hong, J.-H., Ha, J.-O., Kang, J.-Y., Kim, S.Y., 2000.** *ABFs*, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275, pp. 1723-1730
- Côme, D., 1992.** Les végétaux et le froid. Collection Methodes Hermann, éditeur des sciences et des arts. 599p

- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F., 1998.** Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10, pp. 623-638
- Dong, C.-H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q., Zhu, J.-K., 2006.** The negative regulator of plant cold responses, *HOS1*, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, pp. 8281-8286
- Dubcovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L., Tranquilli, G., 1998.** Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetics* 97, pp. 968-975
- Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003.** *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal* 33, pp. 751-763
- Ensminger, I., Busch, F., Huner, N.P.A., 2006.** Photostasis and cold acclimation: Sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 126, pp. 28-44
- Fowler, S., Thomashow, M.F., 2002.** *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14, pp. 1675-1690
- Fowler, S.G., Cook, D., Thomashow, M.F., 2005.** Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiology* 137, pp. 961-968
- Franklin, K.A., Whitelam, G.C., 2007.** Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 39, pp. 1410-1413

- Fricano, A., Rizza, F., Faccioli, P., Pagani, D., Pavan, P., Stella, A., Rossini, L., Cattivelli, L., 2009.** Genetic variants of *HvCbf14* are statistically associated with frost tolerance in a European germplasm collection of *Hordeum vulgare*. *TAG. Theoretical and applied genetics* 119, pp. 1335-1348
- Ganeshan, S., Vitamvas, P., Fowler, D.B., Chibbar, R.N., 2008.** Quantitative expression analysis of selected *COR* genes reveals their differential expression in leaf and crown tissues of wheat (*Triticum aestivum* L.) during an extended low temperature acclimation regimen. *Journal of Experimental Botany* 59, pp. 2393-2402
- Gilmour, S.J., Fowler, S.G., Thomashow, M.F., 2004.** *Arabidopsis* transcriptional activators *CBF1*, *CBF2*, and *CBF3* have matching functional activities. *Plant Molecular Biology* 54, pp. 767-781
- Gilmour, S.J., Seblot, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., Thomashow, M.F., 2000.** Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical change associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 124, pp. 1854-1865
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., Thomashow, M.F., 1998.** Low temperature regulation of the *Arabidopsis* *CBF* family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant Journal* 16, pp. 433-442
- Goday, A., Jensen, A.B., Culianez-Macia, F.A., Mar Alba, M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pages, M., 1994.** The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6, pp. 351-360
- Godoy, J.A., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M., Pintor-Toro, J.A., 1994.** Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Molecular Biology* 26, pp. 1921-1934



- Gupta, A.K., Kaure, N., 2005.** Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30, pp. 761-776
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J.L., Pineda, O., Thomashow, M.F., Zhang, J.Z., 2002.** Transcription factor *CBF4* is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130, pp. 639-648
- Hao, D., Yamasaki K., Sarai, A., Ohme-Takagi, M., 2002.** Determinants in the sequence specific binding of two plant transcription factors, *CBF1* and *NtERF2*, to the DRE and GCC motifs. *Biochemistry* 41, pp. 4202-4208
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998.** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* 21, pp. 535-553
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A., 2000.** Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, pp. 2110-2113
- Heyen, B.J., Alsheikh, M.K., Smith, E.A., Torvik, C.F., Seals, D.F., Randall, S.K., 2002.** The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiology* 130, pp. 675-687
- Hincha, D.K., Zuther, E., Heyer, A.G., 2003.** The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochem. Biophys. Acta*, 1612, pp. 172-177
- Houde, M., Daniel, C., Lachapelle, M., Allard, F., Laliberte, S., Sarhan, F., 1995.** Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant Journal* 8, pp. 583-593

- Houde, M., Dhindsa, R.S., Sarhan, F., 1992.** A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. *Molecular and General Genetics* 234, pp. 43-48
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Hurry, V.M. , Krol, M., Falk, S., Griffith, M., 1993.** Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis Research* 37, pp. 19-39
- Iba, K., 2002.** Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53, pp. 225-245
- Jaglo, K.R., Kleff, S., Amundsen, K.L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J.Z., Deits, T., Thomashow, M.F., 2001.** Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* 127, pp. 910-917
- Jiang, C., Iu B., Singh J., 1996.** Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 30, pp. 679-684
- Jurczyk, B., Rapacz, M., Budzisz, K., Barcik, W., Sasal, M., 2012.** The effects of cold, light and time of day during low-temperature shift on the expression of *CBF6*, *FpCor14b* and *LOS2* in *Festuca pratensis*. *Plant Science* 183 pp. 143-148
- Kagaya, Y., Ohmiya, K., Hattori, T., 1999.** RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research* 27, pp. 470-478
- Kellogg, E.A., 2001.** Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125, pp. 1198-1205

- Kim, S., Soltis, P.S., Wall, K., Soltis, D.E., 2006.** Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Molecular Biology and Evolution* 23, pp. 107-120
- Kimura, M., Yamamoto, Y.Y., Seki, M., Sakurai, T., Sato, M., Abe, T., Yoshida, S., Manabe K., Shinozaki K., Matsui M., 2003.** Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochemistry and Photobiology* 77, pp. 226-233
- Kitajima, S., Sato, F., 1999.** Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125, pp. 1-8
- Knox, A.K., Dhillon, T., Cheng, H., Tondelli, A., Pecchioni, N., Stockinger, E.J., 2010.** *CBF* gene copy number variation at Frost Resistance-2 is associated with levels of freezing tolerance in temperate-climate cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 121, pp. 21-35
- Knox, A.K., Li, C., Vágúfalvi, A., Galiba, G., Stockinger, E.J., Dubcovsky, J., 2008.** Identification of candidate *CBF* genes for the frost tolerance locus Fr-A m2 in *Triticum monococcum*. *Plant Molecular Biology* 67, pp. 257-270.
- Kobayashi, F., Takumi, S., Kume, S., Ishibashi, M., Ohno, R., Murai, K., Nakamura, C., 2005.** Regulation by *Vrn-1/Fr-1* chromosomal intervals of *CBF*-mediated *Cor/Lea* gene expression and freezing tolerance in common wheat. *Journal of Experimental Botany* 56, pp. 887-895
- Kobayashi, F., Takumi, S., Nakata, M., Ohno, R., Nakamura, T., Nakamura, C., 2004.** Comparative study of the expression profiles of the *Cor/Lea* gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance. *Physiologia Plantarum* 120, pp. 585-594
- Leonardos, E.D., Savitch, L.V., Huner, N.P.A., Oquist, G., Grodzinski, B., 2003.** Daily photosynthetic and C-export patterns in winter wheat leaves during cold stress and acclimation. *Physiologia Plantarum* 117, pp. 521-531

- Limin, A.E., Fowler, D.B., 2006.** Low-temperature tolerance and genetic potential in wheat (*Triticum aestivum* L.): Response to photoperiod, vernalization, and plant development. *Planta* 224, pp. 360-366
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1998.** Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, pp. 1391-1406
- Livingston, D.P., Henson, C.A. 1998.** Apoplastic sugars fructans, fructan exohydrolase and invertase in winter oat : responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiol* 16, pp. 403-408
- Livingston, D.P., Tallury, S.P., Owens, S.A., Livingston, J.D., Premkumar, R., 2006.** Freezing in nonacclimated oat: Thermal response and histological observations of crowns during recovery. *Canadian Journal of Botany* 84, pp. 199-210
- Magnani, E., Sjolander, K., Hake, S., 2004.** From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *The Plant Cell* 16, pp. 2265-2277
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., Oda, K., 2004.** *dwarf* and *delayedflowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal* 37, pp. 720-729
- Mahfoozi, S., Limin, A.E., Fowler, D.B., 2001.** Influence of vernalization and photoperiod responses on cold hardiness in winter cereals. *Crop Science* 41, pp. 1006-1011

- Matas, A.J., Agustí, J., Tadeo, F.R., Talón, M., Rose, J.K.C., 2010.** Tissue-specific transcriptome profiling of the citrus fruit epidermis and subepidermis using laser capture microdissection. *Journal of Experimental Botany* 61, pp. 3321-3330
- Medina, J., Bargues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M., Salinas, J., 1999.** The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* 119, pp. 463-469
- Miller, A.K., Galiba, G., Dubcovsky, J., 2006.** A cluster of 11 CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum monococcum*. *Molecular Genetics and Genomics* 275, pp. 193-203
- Miranda, J.F. 2006.** La régulation transcriptionnelle dépendant de l'éthylène. Caractérisation fonctionnelle d'un cofacteur transcriptionnel du type MBF1 et d'un facteur de transcription de la famille des ERF chez la tomate. Thèse de doctorat soutenue à l'institut national polytechnique de Toulouse. France, 159 p
- Mohseni S., 2011.** Identification de polymorphismes au niveau de gènes CBF chez des cultivars de blé possédant des capacités différentes d'acclimatation au froid. Mémoire de maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal, Canada, 64p
- Mohseni, S., Che, H., Djillali, Z., Dumont, E., Nankeu, J., Danyluk, J. 2012.** Wheat CBF gene family : identification of polymorphisms in the CBF coding sequence. *Genome* 55, pp. 865-881
- Monroy, A.F., Dhindsa, R.S., 1995.** Low-temperature signal transduction: Induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell* 7, pp. 321-331
- Monroy, A.F., Dryanova, A., Malette, B., Oren, D.H., Ridha Farajalla, M., Liu, W., Danyluk, J., Gulick, P.J., 2007.** Regulatory gene candidates and gene expression analysis of cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Molecular Biology* 64, pp. 409-423



- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T., Shinshi, H., 2006.** Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology* 140, pp. 411-432
- Neven, L.G., Haskell, D.W., Hofig, A., Li, Q.-B., Guy, C.L., 1993.** Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology* 21, pp. 291-305
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Salinas, J., 2004.** *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, pp. 3985-3990
- Novillo, F., Medina, J., Salinas, J., 2007.** *Arabidopsis CBF1* and *CBF3* have a different function than *CBF2* in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 21002-21007
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., Welin, B.V., 2001.** Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 45, pp. 263-279
- Ohno, R., Takumi, S., Nakamura, C., 2001.** Expression of a cold-responsive *LT-Cor* gene and development of freezing tolerance during cold acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 52, pp. 2367-2374
- Ouellet, F., 2007.** Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *Encyclopedia Of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd*, 6p

- Pearce, R.S., Houlston, C.E., Atherton, K.M., Rixon, J.E., Harrison, P., Hughes, M.A., Alison Dunn, M., 1998.** Localization of expression of three cold-induced genes, *blt101*, *blt4.9*, and *blt14*, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley. *Plant Physiology* 117, pp. 787-795
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelsen, K., 2006.** Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39, pp. 70-82
- Rorat, T., Grygorowicz, W.J., Irzykowski, W., Rey, P., 2004.** Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta* 218, pp. 878-885
- Rorat, T., Szabala, B.M., Grygorowicz, W.J., Wojtowicz, B., Yin, Z., Rey, P., 2006.** Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta* 224, pp. 205-221
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 2000.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 132, pp. 365-386
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002.** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, pp. 998-1009
- Schneider, K., Wells, B., Schmelzer, E., Salamini, F., Bartels, D., 1993.** Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189, pp. 120-131
- Sharma, P., Sharma, N., Deswal, R., 2005.** The molecular biology of the low-temperature response in plants. *BioEssays* 27, pp. 1048-1059

- Shen, Y.-G., Zhang, W.-K., He, S.-J., Zhang, J.-S., Liu, Q., Chen, S.-Y. 2003.** An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theoretical and Applied Genetics* 106, pp. 923-930
- Shigyo, M., Hasebe, M., Ito, M., 2006.** Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene* 366, pp. 256-265
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., 2003.** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6, pp. 410-417
- Skinner, D.Z., Garland-Campbell, K.A., 2008.** Evidence of a major genetic factor conditioning freezing sensitivity in winter wheat. *Plant Breeding* 127, pp. 228-234
- Skinner, J.S., Szucs, P., Zitzewitz, J., Marquez-cedillo L., Filichkin T., Stochinger E.J., Thomashow, F. H., Chen, T. H. H., Hayes, P. M., 2006.** Mapping of barley homologs to genes that regulate low temperature tolerance in *Arabidopsis*. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 112, pp. 832-842
- Skinner, J.S., Von Zitzewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E.J., Hayes, P.M. 2005.** Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large *CBF* gene family in barley. *Plant Molecular Biology* 59, pp. 533-551
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. 1997.** *Arabidopsis thaliana CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, pp. 1035-1040

- Stockinger, E.J., Skinner, J.S., Gardner, K.G., Francia, E., Pecchioni, N., 2007.** Expression levels of barley *CBF* genes at the Frost resistance-locus are dependent upon alleles at *Fr-H1* and *Fr-H2*. *The Plant Journal* 51, pp. 308–321
- Sutton, F., Chen, D.G., Ge, X., Kenefick, D., 2009.** *Cbf* genes of the *Fr-A2* allele are differentially regulated between long-term cold acclimated crown tissue of freeze-resistant and susceptible, winter wheat mutant lines. *BMC Plant Biology* 9, pp. 34
- Suzuki, N., Mittler, R., 2006.** Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126, pp. 45–51
- Tanino, K.K., Mc Kersie, B.D., 1985.** Injury within the crown of winter wheat seedlings after freezing and icing stress. *Revue canadienne de botanique* 63, pp. 432–436
- Thomashow, M.F., 1998.** Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiology* 118, pp. 1–7
- Thomashow, M.F., 1999.** Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 50, pp. 571–599
- Thomashow, M.F., 2010.** Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the *CBF* cold response pathway. *Plant Physiology* 154, pp. 571–577
- Tremblay, K., Ouellet, F., Fournier, J., Danyluk, J., Sarhan, F., 2005.** Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallisation inhibition proteins from cereals. *Plant and Cell Physiology* 46, pp. 884–891
- Tsvetanov, S., Ohno, R., Tsuda, K., Takumi, S., Mori, N., Atanassov, A., Nakamura, C., 2000.** A cold-responsive wheat (*Triticum aestivum* L.) gene *wcor14* identified in a winter-hardy cultivar 'Mironovska 808'. *Genes and Genetic Systems* 75, pp. 49–57

- Tyree, M.T., Sperry, J.S., 1989.** Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, pp. 19-36
- Uemura, M., Steponkus, P.L., 1997.** Effect of cold acclimation on membrane lipid composition and freeze-induced membrane destabilization. Plant cold hardiness. *Molecular Biology, Biochemistry and Physiology*. New York: Plenum, pp.171-179
- Uemura, M., Joseph, R.A., Steponkus, P.L., 1995.** Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*. Effect of plasma membrane and freeze-induced lesions. *Plant physiol*, 109, pp. 15-30
- Upchurch, R.G., 2008.** Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30, pp. 967-977
- Vagujfalvi, A., April, A., Miller, A., Dubcovsky, J., Delugu, G., Galiba, G., Cattivell, L., 2005.** The expression of several *CBF* genes at the Fr-A2 locus is linked to frost resistance in wheat. *Mol Gen Genomics* 247, pp. 506-514
- Viaene, A., Lerut, T., Geboes, K., 1997.** Hybridation *in situ*: un outil polyvalent pour localiser l'expression de genes sur sections tissulaires. *Acta Endoscopia* 27, pp. 117-127
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G., Thomashow, M.F., 2005.** Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 41, pp. 195-211
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, pp. 1-14



- Wang, Z., Triezenberg, S.J., Thomashow, M.F., Stockinger, E.J., 2005.** Multiple hydrophobic motifs in *Arabidopsis CBF1* COOH-terminus provide functional redundancy in trans-activation. *Plant Molecular Biology* 58, pp. 543-559
- Winfield, M.O., Lu, C., Wilson, I.D., Coghill, J.A., Edwards, K.J., 2010.** Plant responses to cold: transcriptome analysis of wheat. *Plant Biotechnology Journal* 8, pp. 749-771
- Wise, M.J., 2003.** LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4, pp. 1-19
- Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T.J., Yu, X.-M., Griffith, M., 1999.** Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum* 105, pp. 600-608
- Xue, G.P., 2002.** An AP2 domain transcription factor *HvCBF1* activates expression of cold-responsive genes in barley through interaction with a (G/a)(C/t)CGAC motif. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577, pp. 63-72
- Xue, G.-P., 2003.** The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator *HvCBF2* involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. *Plant Journal* 33, pp. 373-383
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2005.** Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *TRENDS in Plant Science* 10, pp. 88-94
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006.** Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57, pp. 781-803

- Zachariassen, K.E., Kristiansen, E., 2000.** Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology* 41, pp. 257-279
- Zarka, D.G., Vogel, J.T., Cook, D., Thomashow, M.F., 2003.** Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology* 133, pp. 910-918
- Zhao, D., Shen, L., Fan, B., Yu, M., Zheng, Y., Lv, S., Sheng, J., 2009.** Ethylene and cold participate in the regulation of *LeCBF1* gene expression in postharvest tomato fruits. *FEBS Letters* 583, pp. 3329-3334
- Zhao, Y.X., Liu, P., Xu, Z.S., Chen, M., Li, L.C., Chen, Y.F., Xiong, X.J., Ma, Y.Z., 2008.** Analysis of specific binding and subcellular localization of wheat ERF transcription factor *W17*. *Agricultural Sciences in China* 7, pp. 647-655
- Zhu, J., Gong, Z., Zhang, C., Song, C.-P., Damsz, B., Inan, G., Koiwa, H., Bressan, R.A., 2002.** OSM1/SYP61: A syntaxin protein in *Arabidopsis* controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell* 14, pp. 3009-3028
- Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W., Zhang, H., 2010.** The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor *RAP2.6* participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene* 457, pp. 1-12